Untersuchungen zum herzglykosidhemmbaren K (Rb)-Transport am Arbeitsmyokard des Säugetieres

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Johannes Thielen
Bochum 1982

Im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 114 „Bionach"

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547222_0040

Untersuchungen zum herzglykosidhemmbaren K (Rb)-Transport am Arbeitsmyokard des Säugetieres

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Johannes Thielen
Bochum 1982

Im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 114 „Bionach"

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINER MUTTER

Mephisto:

Was ihr nicht tastet, steht euch meilenfern,
Was ihr nicht faßt, das fehlt euch ganz und gar,
Was ihr nicht rechnet, glaubt ihr, sei nicht wahr,
Was ihr nicht wägt, hat für euch kein Gewicht,
Was ihr nicht münzt, das, meint ihr, gelte nicht.

Faust,
J. W. v. GOETHE

Herrn Prof. Dr. H.G. Glitsch danke ich für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung. Herrn Dr. H. Pusch danke ich für zahlreiche anregende Diskussionen während der Anfertigung dieser Arbeit. Frau A. Balzer-Ferrai gilt mein besonderer Dank für die stets hilfsbereite technische Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	
1.1	Grundzüge der Anatomie und Physiologie des Herzmuskels	1
1.2	Verteilung von Na und K an der Herzmuskelzellmembran und das Membranpotential	4
1.3	Das Modell des gerichteten aktiven Na-K-Transports	5
1.3.1	Die enzymatische Grundlage des aktiven Na-K-Transports	6
1.3.2	Eigenschaften des aktiven Na-K-(Rb)-Transports	10
1.4	Erfassung der aktiven Na-K-(Rb)-Pumpe mit elektrophysiologischen und optischen Methoden	17
2.	Darlegungen zur theoretischen Analyse	
2.1.1	Die Michaelis-Menten Gleichung	21
2.1.2	Darstellung von Meßdaten nach Lineweaver & Burk	25
2.1.3	Darstellung von Meßdaten nach Eisenthal & Cornish-Bowden	26
2.1.4	Abschätzung von Substratbindungsstellen: Das Hill-Diagramm	27
2.2	Theoretische Grundlagen zur quantitativen Erfassung der K-aktivierten Zellantwort	29
2.2.1	Das Modell zur Beschreibung des K-aktivierten Membranstromes	29
2.2.3	Ableitung der Zeitkonstanten τ als Funktion von K_o	34
2.2.4	Die Geschwindigkeitskonstante k zur Abschätzung der Substratbindungsstellen: Der Hill-Koeffizient	36

		Seite
3.	Methodik	
3.1	Präparation	37
3.2	Versuchsablauf der Versuchsserie I	39
3.2.1	Serie I A: K^+- bzw. Rb^+-Aufnahme in Vorhofpräparate als Funktion der K_o bzw. Rb_o	39
3.2.2	Serie I B: Rb-Aufnahme in Vorhofpräparate als Funktion der Na_i	41
3.2.3	Messung der Kationenkonzentrationen mit optischen Methoden	43
3.2.4	Berechnung der Kationenkonzentrationen	44
3.2.5	Berechnung der passiven und aktiven K-(Rb)-Aufnahme	45
3.3	Versuchsablauf der Versuchsserie II	45
3.3.1	Kontinuierliche intrazelluläre Messung der K-aktivierten Membranpotentialänderung an Trabekelpräparaten	45
3.3.1.1	Meßplatzaufbau	46
3.3.1.2	Messung des Membranpotentials durch intrazelluläre Mikroelektroden	47
3.3.2	Graphische Ermittlung charakteristischer Größen der K-induzierten Hyperpolarisation	48
3.4	Statistische Behandlung der Meßwerte	48
4.	Ergebnisse	
4.1	Versuchsserie I A: Die aktive K-(Rb)-Aufnahme in Meerschweinchenvorhofpräparate	49
4.1.1	Bestimmung der intrazellulären Na- und K-Konzentration im steady state der Präparate	49
4.1.2	Aktive Rb-Aufnahme der Präparate im steady state	50
4.1.3	Aktive Rb-Aufnahme als Funktion der extrazellulären Rb-Konzentration nach Konditionierung der Präparate	50

		Seite
4.1.4	Aktive K-Aufnahme als Funktion der extrazellulären K-Konzentration nach Konditionierung der Präparate	56
4.1.5	Kinetische Analyse der Ouabain-hemmbaren K- bzw. Rb-Aufnahme	58
4.2	Versuchsserie I B: Die aktive Rb-Aufnahme in Vorhofpräparate als Funktion der Na_i	62
4.2.1	Abschätzung der Na_i-Bindungsstellen am Na-K-Transportsystem aufgrund des Ouabain-hemmbaren Rb-Einwärtstransports (Hill-Diagramm)	65
4.2.2	Abschätzung der K_o(Rb_o)-Bindungsstellen am Na-K-(Rb)-Transportsystem aufgrund des Ouabain-hemmbaren K-(Rb)-Einwärtstransports	69
4.3	Versuchsserie II: Kontinuierliche intrazelluläre Messung der K-aktivierten Membranpotentialänderung an Vorhofzellen	73
4.3.1	Messung der K-aktivierten Membranpotentialänderung	75
4.3.2	Bestimmung der Zeitkonstante τ des Membranpotentialverlaufs nach Konditionierungszeiten in K-freier Tyrodelösung	78
4.3.3	Wirkung von Dihydro-(g-Strophanthin) auf das Membranpotential von Trabekelpräparaten	83
4.3.4	Ist eine lokale K_o-Verarmung an der Zellmembran eine Ursache der K-aktivierten Antwort?	92
4.3.5	Bestimmung von ΔV_{max} und τ als Funktion der Konditionierungsdauer in K-freier Lösung	98
4.3.6	Die Zeitkonstante τ als Funktion der K_o	103
4.3.7	Bestimmung des Hill-Koeffizienten aus den Geschwindigkeitskonstanten der K-aktivierten Zellantwort	108

		Seite
5.	Diskussion	
5.1	Die Aktivierung des Ouabain-hemmbaren K-Transportsystems	112
5.2	Bestätigung von 3 Na_i- und 2 K_o-Bindungsstellen am Na-K-Transportsystem des Arbeitsmyokards	117
5.3	Der Beitrag der Na-K-Pumpe zum Membranpotential	121
6.	Zusammenfassung	130
7.	Liste der verwendeten Abkürzungen	133
8.	Literaturverzeichnis	134

1. Einleitung

1.1 Grundzüge der Anatomie und Physiologie des Herzmuskels

Lebenslang fortdauernde rhythmische Aktivität des Herzmuskels ist eine Voraussetzung für das Funktionieren des Kreislaufs im Säugetier-Organismus. Die Bedeutung des Herzens als Druckpumpe im Kreislaufsystem der Säugetiere und des Menschen wurde von William H a r v e y erkannt und etwa ab 1619 von ihm gelehrt. Die Veröffentlichung seiner Erkenntnisse über die Herzfunktion im Kreislaufsystem erfolgte 1628 (Literatur bei LONGMORE 1971).

Das Herz arbeitet als Ventilpumpe. Bei der Kontraktion der Herzkammermuskulatur (Systole) wird das Blut in die Arterien gedrückt, bei der Erschlaffung (Diastole) füllt sich der Hohlmuskel mit Blut. Bei den Säugern liegt eine vollständige Trennung zwischen Lungen- und Körperkreislauf durch die Ausbildung von vier Herzhöhlen vor. Die Herzklappen gewährleisten den gerichteten Blutfluß von sauerstoffreichem und sauerstoffärmerem Blut durch das Herz und damit die ausreichende Versorgung der Peripherie des Organismus mit oxygeniertem im Kreislaufsystem zirkulierenden Blut.

Entwicklungsgeschichtlich leitet sich das Herz der Wirbeltiere aus einem anfangs geraden, später S-förmig gebogenen und gekammerten Rohr mesodermalen Ursprungs im Bereich der Vorderdarmtasche ab (vgl.SCHWARTZ 1973). Im Laufe der Gewebedifferenzierung bilden sich zwei morphologisch verschiedene Arten von Herzmuskelzellen heraus:

a) Zellen des Arbeitsmyokards
b) Zellen des Erregungsleitungssystems (s. LEONHARDT 1974).

Die mengenmäßig weit überwiegenden Zellen des Arbeitsmyokards bilden ein funktionelles Syncytium von quergestreiften Muskelfaserzügen mit großem Fibrillenreichtum. Im Gegensatz zum Skelettmuskelgewebe liegt der Zellkern inmitten der Herzmuskelzelle, somit stellt das Herzmuskelgewebe eine Sonderform der quergestreiften Muskulatur dar. Wie jede Art von Muskulatur kann sich die Muskulatur des Arbeitsmyokards verkürzen, kann Spannung entwickeln und mechanische Arbeit leisten.

Die Zellen des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems sind fibrillenarm und sarkoplasmareich. Ihre ventrikulären Anteile werden als HIS-Bündel, die feinen Endverzweigungen als Purkinje-Fasern bezeichnet. Diese Zellen haben einen größeren Durchmesser als die Zellen des Arbeitsmyokards; sie besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Kontraktion. Eine morphologische Besonderheit im Feinbau der Purkinje-Fasern liegt im Fehlen der transversalen Tubuli (SOMMER & JOHNSON 1968), was neben dem größeren Durchmesser (s. BARGMANN 1967) zu einer Erhöhung der Leitungsgeschwindigkeit beitragen kann (s. McNUTT & FAWCETT in: LANGER & BRADY 1974). Die elektrische Erregung des Säugerherzens wird autonom in bestimmten Arealen, den Schrittmacherzellen, gebildet. Primär entsteht sie im Sinusknoten, über die Vorhofmuskulatur läuft die Erregungswelle zum Atrio-ventrikular-Knoten und wird dann über das HIS-sche Bündel und die Purkinje-Fasern zum Ventrikelmyokard geleitet.

Die Kontraktion der Muskelzellen als Antwort auf die Erregung wird durch die Vorgänge der elektromechanischen Kopplung hervorgerufen. Die Zeitdauer einer Herzaktion von Systole und Diastole beträgt beim Menschen etwa 0.8 Sekunden. Um ein ausreichendes Schlagvolumen des Herzens zu erreichen, ist es notwendig, daß eine koordinierte Kontraktionswelle von der Ventrikelspitze ausgeht und über die Arbeitsmuskulatur zur Kammerbasis verläuft.

Dies wird durch die unterschiedliche Leitungsgeschwindigkeit der Erregung in Ventrikelmuskulatur und Reizleitungsgewebe erreicht (HOFFMANN & CRANEFIELD 1960, vgl. SCHMIDT & THEWS 1977).

Die Vorhofmuskulatur des Säugerherzens ähnelt im wesentlichen Bau der Ventrikelmuskulatur, mechanisch wird jedoch weniger Spannung entwickelt. Vorhofzellen sind von geringerer Größe als Ventrikelmuskelzellen, und das T-System ist im allgemeinen weniger gut ausgebildet (s. McNUTT & FAWCETT 1974 in: LANGER & BRADY 1974).

Bei physiologischen Fragestellungen an unterschiedlichen Herzmuskelpräparaten ist daher die unterschiedliche Differenzierung der Gewebe zu beachten (s. FOZZARD & SLEATOR 1967).

Eine verminderte Leistungsfähigkeit des Herzmuskels (Herzinsuffizienz) kann u. a. auftreten aufgrund einer verminderten Sauerstoffversorgung, durch Minderleistungen des Stoffwechsels der Herzmuskelzellen oder durch pathologische Änderungen in der elektromechanischen Kopplung (s. REINDELL & ROSKAMM 1977).

Zur medikamentösen Besserung der Kontraktionskraft des insuffizienten Herzens finden beim Menschen Herzglykoside Anwendung. Diese Substanzen wurden 1785 durch W. WITHERING in die Therapie eingeführt und haben bei der Behandlung der Herzmuskelschwäche eine große Bedeutung erlangt (vgl. SCHWARTZ 1977). In der experimentellen Forschung kommt den Herzglykosiden als spezifischen Hemmstoffen von Kationentransportvorgängen an biologischen Membranen eine Bedeutung zu.

1.2 Verteilung von Na und K an der Herzmuskelzellmembran und das Membranpotential

Die Höhe des Membranpotentials wird hauptsächlich durch das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer K-Konzentration bestimmt (BOYLE & CONWAY 1941).

Biologische Membranen sind in Ruhe für Na und K permeabel; dies wurde an unterschiedlichen Präparaten mit Hilfe von Radioisotopen nachgewiesen (an Erythrozyten GLYNN 1956, an Nervenpräparaten KEYNES 1951, am Skelettmuskel HARRIS 1950, KEYNES 1954, an glatter Muskulatur CASTEELS 1969 und am Herzmuskel JOHNSON 1957, HAAS, GLITSCH & TRAUTWEIN 1963).

Im Plasma der Herzmuskelzelle ist die K-Konzentration (K_i) mit einem Wert von 150 mM etwa 30-fach höher als im extrazellulären Milieu. Die Konzentration an Na-Ionen beträgt in der extrazellulären Lösung etwa 150 mM (Na_o), etwa 1/10 dieser Na-Konzentration findet sich im Zellplasma (vgl. WEIDMANN 1956, vgl. LANGER 1968). Bei einer K-Konzentration in der Badlösung von 5 mM beträgt die Potentialdifferenz über der Herzmuskelzellmembran an Vorhof und Kammer etwa -75 mV, dabei ist das Zellinnere negativ.

Aufgrund der elektrochemischen Gradienten über der Zellmembran entsteht ein Ein- und Ausstrom permeabler Ionen; diejenigen Potentialwerte, bei denen die Summe aus Ein- und Ausstrom einer bestimmten Ionensorte gleich Null ist, bezeichnet man als Gleichgewichtspotentiale. Die Gleichgewichtspotentiale für Na (E_{Na}) und K (E_K) lassen sich aus der Kenntnis der Konzentrationsverhältnisse nach der NERNST-schen Gleichung für Diffusionspotentiale berechnen (NERNST 1889). Das Membranpotential weicht unter physiologischen Bedingungen im Fließgleichgewicht von den berechneten Gleichgewichtspotentialen ab, es ist weniger negativ als das Gleichgewichtspotential E_K, aber etwa 125 mV negativer als E_{Na}.

Aufgrund des bestehenden elektrochemischen Gradienten erwartet man an elektrisch erregbaren Zellen einen netto Na-Influx (Na-Aufnahme). Aus der Abweichung des Ruhemembranpotentials von E_K ergibt sich für K ein netto Efflux. Dadurch sollte im Laufe der Zeit ein Konzentrationsausgleich zwischen den intra- und extrazellulären Na- und K-Konzentrationen erfolgen. Dieser Abbau der elektrochemischen Gradienten hätte eine Depolarisation und Unerregbarkeit der Zelle zur Folge. Für den physiologischen Zustand der Zellen ist somit die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Na- und K-Verteilung notwendig.

1.3 Das Modell des gerichteten aktiven Na-K-Transports

Unter physiologischen Bedingungen sind Kationenverteilung und Membranpotential an vielen Präparaten über lange Zeiträume konstant. Aus diesem Befund wurde auf Mechanismen geschlossen, die den passiven Ionenbewegungen entgegenwirken. Dabei werden die Kationen entgegen den entsprechenden elektrochemischen Gradienten über der Zellmembran transportiert (Lit.: bei LANGER 1968, s. LÜTTGAU & GLITSCH 1976). Stammt die Energie für einen Transport gegen einen elektrochemischen Gradienten direkt aus dem Stoffwechsel der Zelle, so wird dieser Transport nach der Definition von USSING (1949) aktiv genannt.

Der Transportmechanismus, der Na^+ aktiv unter Einsatz von Stoffwechselenergie aus der Zelle hinausschafft und K^+ in die Zelle hineintransportiert, wird als Na-K-Pumpe bezeichnet. Die Abhängigkeit des Na-K-Transportes vom Stoffwechsel energiereicher Phosphate wurde an Erythrozyten (GLYNN 1956), am Tintenfischaxon (HODGKIN & KEYNES 1955), am Froschskelettmuskel (KEYNES & MAISEL 1954) und am Froschvorhof (HAAS, HANTSCH, OTTER & SIEGEL 1967) nachgewiesen.

Eine Na-K-stimulierbare, Mg-abhängige ATPase, die gemeinsame Eigenschaften mit dem Na-K-Transportsystem aufweist, konnte 1957 von SKOU aus Nervenhomogenaten isoliert werden. Diese ATPase ist in der Zellmembran sehr vieler tierischer Zellen vorhanden (s. SKOU 1965) und kann als enzymatische Basis des aktiven Na- und K-Transports über die Membran angesehen werden. Zwei getrennte Betrachtungsweisen führen zu einer Modellvorstellung des aktiven Na- und K-Transports. Wird vorrangig die enzymatische Reaktion betrachtet, so steht die ATPase Aktivität im Vordergrund, dabei wird ATP als Substrat und die Kationen Na^+ und K^+ werden als Kofaktoren angesehen. Richtet sich die Betrachtung auf den Transportmechanismus für Na- und K-Ionen, so sind die Kationen Na^+ und K^+ die Substrate der Pumpe, und ihre Translokation durch die Zellmembran entspricht formal der Umwandlung eines Substrates in ein Produkt.

1.3.1 Die enzymatische Grundlage des aktiven Na-K-Transports

Die Abb. 1 zeigt das nach EPSTEIN (1975) modifizierte Schema der ATPase Aktivität und der damit verbundenen Translokation von Na^+ und K^+ (Rb^+) durch die Zellmembran. Da K^+ bei der Aktivierung der ATPase durch Rb^+ ersetzt werden kann (SKOU 1960, POST et al. 1960) und Rb^+ in der vorliegenden Arbeit zur kinetischen Analyse des Ionentransports benutzt wurde, wurde die Möglichkeit der Translokation von Rb^+ durch die Membran in das Schema einbezogen.

Die Na-K-Pumpe ist asymmetrisch in der Zellmembran orientiert, so daß die Na-Bindungsstelle (hohe Affinität für Na^+: E_1ATP) an der inneren Membranoberfläche und die K-Bindungsstelle (hohe Affinität für K^+: E_2-P) an der äußeren Membranoberfläche vorliegt. Auf die Existenz getrennter Bindungsstellen für Na^+ und K^+ wurde aus den Aktivierungskurven der

Na-K-ATPase bei Variation der Na^+ bzw. K^+-Konzentration geschlossen (SKOU 1957, 1960). Aus der Orientierung der Pumpe resultiert die gerichtete Arbeitsweise und damit die Konstanz der asymmetrischen Na^+ und K^+-Verteilung über der Zellmembran unter physiologischen Bedingungen.

Die physiologische Arbeitsweise des Transportmechanismus ist im Schema der Abbildung 1 im Uhrzeigersinn eingetragen und durch die ausgefüllten Pfeilspitzen veranschaulicht. Der Ablauf der entgegengesetzten Reaktionsrichtung (offene Pfeilspitzen) kann durch die Wahl entsprechender experimenteller Bedingungen an Erythrozyten (GLYNN et al. 1970) erreicht werden. Untersuchungen zur Affinität der Kationen Na^+ und K^+ zu Enzympräparationen (POST et al. 1972) erbrachten ebenfalls Hinweise zur Aufklärung der einzelnen Reaktionsschritte (s. GLYNN & KARLISH 1975).

In Reaktionsschritt a) wird unter ATP Hydrolyse und Aufnahme von 3 Na^+ das phosphorylierte Zwischenprodukt $Na_3^+ \cdot E_1$-P gebildet (POST et al. 1969). Der Reaktionsschritt b) stellt die Mg-abhängige Umwandlung des Enzyms in die E_2-P-Form und die Translokation von 3 Na^+ von der Membraninnenseite zur Außenseite dar. 2 K^+ (bzw. $2Rb^+$) verbinden sich mit dem phosphorylierten Enzymmolekül E_2-P (Reaktionsschritt c), das sich dann zur Membraninnenseite bewegt. Dort wird anorganisches Phosphat P_i freigesetzt, und es entsteht K_2^+-E_2 (Rb_2^+-E_2). Experimentelle Befunde an Enzympräparationen weisen darauf hin (POST et al. 1972), daß K^+ (Rb^+) nach der Freisetzung von P_i an das Enzym gebunden bleibt. Die K^+ (Rb^+)-Freisetzung vom Enzym (Reaktionsschritt d) benötigt relativ hohe (0.1 - 1.0 mM) ATP-Konzentrationen (POST et al. 1972, s. SKOU 1975).

Herzglykoside, z. B. g-Strophanthin (Ouabain) sind spezifische Hemmstoffe der Na-K-ATPase und der Na-K-Pumpe (SCHATZMANN 1953, s. SKOU 1965), ihr Angriffspunkt ist an

der Außenseite der Zellmembran, ihre Hemmwirkung ist im Schema der Abb. 1 durch den doppelt gestrichenen Pfeil angegeben. Daß es die E_2-P-Form des Enzyms ist, die mit Ouabain reagiert, konnte durch Variation der E_2-P-Konzentration und der entsprechenden positiven Korrelation der Affinität des Enzyms zu Ouabain nachgewiesen werden (LINDENMAYER et al. 1968, SIEGEL et al. 1969).

Kinetische Größen, die den Na-K-Transport und die Na-K-ATPase Aktivität quantifizieren, können Angaben über Art und Anzahl der möglichen Reaktionsmechanismen des Systems und damit zu einem Modell des aktiven Transports liefern.

Für eine enzymatische Reaktion stellt die Halbsättigungskonstante (K_m-Wert) ein Maß der Affinität des Enzyms zum Substrat dar und liefert eine charakteristische Größe des Enzyms. Durch eine doppelt-reziproke Auftragung der Substratkonzentration gegen die Umsatzgeschwindigkeit in einem Diagramm nach LINEWEAVER & BURK (s. Lehrbücher der Biochemie, z. B. LEHNINGER 1970) können aus dem linearen Kurvenverlauf die kinetischen Größen K_m und V_{max} (maximale Reaktionsgeschwindigkeit) leicht ermittelt werden. Erhält man in der doppelt-reziproken Auftragung einen nicht-linearen Kurvenverlauf, so können dafür verschiedene Gründe die Ursache sein (s. KOTYK 1977). Einer der möglichen Gründe ist die kooperative Wechselwirkung zwischen mehreren Substratbindungsstellen am Enzymmolekül.

Ein Hinweis auf kooperatives Verhalten von Substratbindungsstellen am Enzymmolekül ergibt sich aus dem sigmoiden Verlauf der Na-K-ATPase Aktivität als Funktion der Na^+- bzw. K^+-Konzentration (s. SCHWARTZ, LINDENMAYER & ALLEN 1972).

Das Vorliegen mehrerer Na^+- und K^+-Bindungsstellen an der Na-K-ATPase wurde gezeigt (ROBINSON 1967), und die Anzahl von 3 Na^+ bzw. 2 K^+-Bindungsstellen am Enzymsystem wird als gültig angenommen (s. SKOU 1965, STEKOVEN & BONTING 1981).

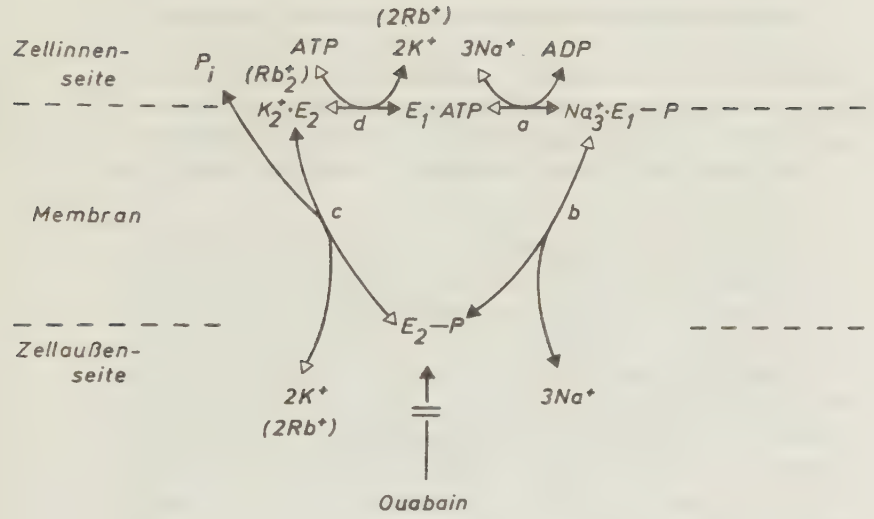


Abb. 1: Schematische Darstellung der Arbeitsweise des Na-K-Transportsystems in der Zellmembran, modifiziert nach EPSTEIN (1975).

Die gestrichelten Linien stellen die beiden Oberflächen der Zellmembran dar; die physiologische Richtung des Na-K-Transports ist durch ausgefüllte Pfeilspitzen, die entgegengesetzte Reaktionsweise, die durch bestimmte experimentelle Bedingungen erzielt werden kann, ist durch offene Pfeilspitzen angegeben. Die Hemmwirkung von Ouabain (g-Strophanthin) an der Außenseite der Zellmembran ist durch den doppelt gestrichenen Pfeil dargestellt. Die Teilreaktionen a bis d werden im Text beschrieben.

1.3.2 Eigenschaften des aktiven Na-K-(Rb)-Transports

Zur Untersuchung des aktiven Na-K-Transports stehen verschiedene zellphysiologische Methoden zur Verfügung. Die Ermittlung intrazellulärer Kationenkonzentrationen kann aus flammenphotometrischen Bestimmungen der Kationenkonzentration in einem Präparat erfolgen. Dabei ist die Kenntnis der Größe des Extrazellulärraumes notwendig, damit der zelluläre Gehalt errechnet werden kann.

Durch die spezifische Hemmung des Na-K-Transportsystems mit Herzglykosiden können die Nettoionenfluxe in ihre aktiven und passiven Komponenten unterschieden werden. Untersuchungen der unidirektionalen Flüsse an Erythrozyten mit Radioisotopen brachten erste Hinweise auf die Abhängigkeit des Transportsystems von den Na- und K-Konzentrationen (GLYNN 1956), über die stöchiometrische Beziehung zwischen K-Aufnahme und Na-Auswärtstransport sowie über die Stoffwechselabhängigkeit (s. GLYNN & KARLISH 1975). An Riesenaxonen (HODGKIN & KEYNES 1955), Skelettmuskelfasern (CROSS, KEYNES & RYBOVA 1965) und Herzmuskelzellen (HAAS et al. 1967) wurden ebenfalls mit radioaktiv markierten Kationen die Charakteristika des Transportmechanismus untersucht. Genauere Aussagen liefern die Messungen mit ionenselektiven Mikroelektroden, da sie mit einer hohen zeitlichen Auflösung Änderungen der intrazellulären Ionenaktivität erfassen können. An Herzmuskelzellen ist der Einsatz dieser Meßmethode durch die geringe Zellgröße schwierig und damit nicht an allen Präparaten möglich. Ein Vergleich der flammenphotometrisch bestimmten Kationenkonzentration mit den durch ionenselektiven Elektroden ermittelten Ionenaktivitäten wurde von LEE & FOZZARD (1975) am Katzenpapillarmuskel durchgeführt.

Nach Ansicht dieser Autoren liegt der Vorteil der Bestimmung der Ionenaktivitäten darin, daß nur die freien, nicht gebun-

denen Anteile der Ionen, die für die Höhe des Membranpotentials relevant sind, berücksichtigt werden. Elektrophysiologische Untersuchungen durch intrazelluläre Messungen des Membranpotentials ermöglichen ebenfalls Rückschlüsse auf die Aktivität der Na-K-Pumpe.

Die Aufhebung des Fließgleichgewichts der Zelle (steady state) kann eine genauere Untersuchung des Na-K-Transports erleichtern, da der Transport unter diesen Bedingungen aktiviert wird und Messungen einfacher zugänglich ist. Nach einer Hemmung der Na-K-Pumpe an Herzpräparaten durch Stoffwechselinhibitoren (HAAS et al. 1967), durch Unterkühlung der Präparate (PAGE & STORM 1965, GLITSCH 1969, HIRAOKA & HECHT 1973), durch Herzglykoside (ISENBERG & TRAUTWEIN 1974) oder durch Bespülung mit K-freien Lösungen (NOMA & IRISAWA 1975, GADSBY 1980b) (Konditionierung) wurde der aktive Na-K-Transport unter aktivierten Bedingungen gemessen. An Präparaten des Säugerherzens liefert die Bestimmung der Ionenflüsse (GLITSCH et al. 1976) wie auch elektrischer Phänomene (GADSBY & CRANEFIELD 1979b) Aufschluß über die Pumpaktivität. An der Herzmuskelzellmembran kann K^+ durch Rb^+ ersetzt werden (YAMAMOTO et al. 1979, EISNER & LEDERER 1980a, 1980b), und die aktive Rb-Aufnahme kann somit zur Untersuchung des Transportsystems benutzt werden.

Da der unidirektionale Rb-Influx mit Hilfe der flammenphotometrischen Konzentrationsmessungen bestimmt werden kann, läßt sich die aktive Rb-Aufnahme in die Zelle mit einer einfachen Methode ermitteln. Sie stellt ein geeignetes Maß zur quantitativen Erfassung der kinetischen Größen des Transportsystems dar.

An vielen tierischen Zellen, z. B. am Katzenpapillarmuskel (PAGE & STORM 1965), konnte nachgewiesen werden, daß eine Erhöhung der intrazellulären Na-Konzentration den aktiven Na-K-Transport stimuliert und eine Erhöhung der extrazellu-

lären K-Konzentration den Na-Auswärtstransport aus Zellen mit erhöhter Na_i steigert (s. GLITSCH 1979).

An Sinusknotenzellen des Kaninchenherzens (NOMA & IRISAWA 1975), an Purkinjefasern des Schafsherzens (HIRAOKA & HECHT 1973) und an Meerschweinchenvorhofpräparaten (GLITSCH 1972a) konnte dieser Befund bestätigt werden. Weiter zeigten Untersuchungen am Säugerherzen, daß bei Reaktivierung der Na-K-Pumpe a^i_{Na} exponentiell mit der Zeit abnimmt (DEITMER & ELLIS 1978, GLITSCH & PUSCH 1980).

Versuche an Skelettmuskeln des Frosches (CONWAY, KERNAN & ZADUNAISKY 1961), an Katzenpapillarmuskeln (PAGE & STORM 1965) wie auch an Meerschweinchenvorhöfen (GLITSCH 1969) belegen, daß für die Aktivierung des Na-Auswärtstransports extrazellulär K-Ionen notwendig sind. In K-freien Badlösungen verringerte sich die durch Unterkühlung erhöhte Na_i der Präparate beim Wiedererwärmen nicht (GLITSCH 1969), und das Membranpotential der Muskelzellen erreichte nicht die vor Unterkühlung gemessene Höhe.

Messungen des ^{22}Na-Efflux an Purkinjefasern zeigten, daß bei einer Änderung der extrazellulären K-Konzentration (K_o) zwischen 5.4 mM und 16.2 mM nach einer vorausgehenden Bespülung der Präparate mit K-freier Lösung nur eine geringe Änderung des ^{22}Na-Efflux erreicht wurde (BOSTEELS & CARMELIET 1972). Diese geringe Beeinflussung des Na-Efflux spricht für eine halbmaximale Aktivierung (K_m-Wert) durch K_o viel kleiner als 5.4 mM.

Für Purkinjefasern des Hundeherzens ermittelte GADSBY einen K_m-Wert von 1 mM (GADSBY 1980b), DEITMER & ELLIS (1978) bestimmten an Schafspurkinjefasern dagegen aufgrund ihrer Experimente einen K_m-Wert von 10 bis 12.5 mM. GLITSCH und Mitarbeiter (GLITSCH et al. 1981) zeigten am gleichen Präparat eine halbmaximale Aktivierung der Na-K-Pumpe zwischen 1.6 und 3.7 mM durch extrazelluläre K-(Rb) Ionen.

Für Präparate des Meerschweinchenvorhofes wurde die halbmaximale Aktivierung der Na-Pumpe bei K_o=1.5 mM ermittelt (GLITSCH et al. 1978).

Die Effektivität anderer Kationen, K_o zu ersetzen, ist u. a. an Nervenpräparaten des Kaninchens (RANG & RITCHIE 1968), an Schafspurkinjefasern (EISNER & LEDERER 1980b) sowie an der Na-K-ATPase des Meerschweinchenherzens (PORTIUS & REPKE 1967) untersucht worden. Am Froschskelettmuskel wurde gezeigt, daß Rb^+ das extrazelluläre K^+ bei der Aktivierung der Na-K-Pumpe ersetzen kann (ADRIAN & SLAYMAN 1966), und an Vagusnervenpräparaten des Kaninchens wurden K^+ und Rb^+ als gleich effektiv zur Pumpaktivierung ermittelt (RANG & RITCHIE 1968). An Purkinjefasern des Rinder- oder Schafsherzens kann die Na-K-Pumpe durch Rb_o (MÜLLER 1964) oder Cs_o aktiviert werden (EISNER & LEDERER 1980b). Die Aufnahme von ^{86}Rb in Ventrikelgewebe des Meerschweinchenherzens wurde durch Herzglykoside gehemmt (YAMAMOTO, AKERA & BRODY 1979) und kann als Maß der Na-K-Pumpaktivität dienen (KU, AKERA, PEW & BRODY 1974).

Bestimmungen der Aktivierung des Transportsystems durch Rb_o ergaben an Schafspurkinjefasern einen K_m-Wert von 1 bis 4 mM Rb_o (EISNER, LEDERER & VAUGHAN-JONES 1981b).

Untersuchungen der Na^+- und K^+-Fluxe über der Zellmembran liefern Kenntnisse zu Eigenschaften der Na-K-Pumpe (s. GLYNN & KARLISH 1975), und durch Bestimmung der HILL-Koeffizienten kann auf die Zahl der Bindungsstellen am Transportsystem geschlossen werden (s. SCHWARTZ, LINDENMEYER & ALLEN 1972). An Erythrozyten (GARRAHAN & GLYNN 1967, PRIESTLAND & WHITTAM 1968) und am Tintenfischriesenaxon (BAKER et al. 1969) ergab sich eine sigmoide Charakteristik der Na^+ bzw. K^+-Fluxe über der Zellmembran als Funktion der Na bzw. K-Konzentration im Medium.

Die spezifische Hemmung des aktiven Na-K-Transports durch Herzglykoside wurde an verschiedenen Geweben gezeigt (s. SKOU 1965, THOMAS 1972), und die Dosis-Wirkungsbeziehung der Ouabain hemmbaren ^{86}Rb-Aufnahme in Hundeventrikelgewebe (50 % Hemmung bei 10^{-6} M Ouabain, HOUGEN & SMITH 1978) stimmt mit den an Meerschweinchenherzmuskelpräparaten gewonnenen Befunden für die Hemmung der Na-K-Pumpe überein (KU et al. 1974).
Am Froschskelettmuskel wurde der Transport von 3 Na^+ pro hydrolysiertem ATP-Molekül nachgewiesen (DYDYNSKA & HARRIS 1966), und die Übersicht der Literatur (s. GLYNN & KARLISH 1975, s. SKOU 1975) ergibt für das Modell der Na-K-Pumpe eine herzglykosidhemmbare Verschiebung von 3 Na^+ und 2 K^+-Ionen pro Transportzyklus über der Membran.

Änderungen des Membranpotentials Na_i-beladener und K_i-verarmter Froschskelettmuskelzellen wurden von CROSS, KEYNES & RYBOVA (1965) eingehend untersucht. Nach der Konditionierung der Präparate in kalter, K-freier Lösung konnte durch Zugabe von 10 mM KCl zur Ringerlösung eine Zunahme des Membranpotentials ausgelöst werden. An Vagusnervenpräparaten des Kaninchens wurde nach elektrischer Reizung eine Hyperpolarisation des Membranpotentials gemessen, die abhängig von K_o war (RANG & RITCHIE 1968). Eine solche K_o abhängige Erhöhung des Membranpotentials wird als K-aktivierte Antwort der Zelle bezeichnet.

Die Befunde von CROSS et al. (1965) bestätigten frühere Ergebnisse (STEINBACH 1940, DESMEDT 1953, KERNAN 1962) und wurden unter dem Gesichtspunkt des Ladungstransportes diskutiert. Stehen die Größe des aktiven Na^+-Efflux und des K^+-Influx im Verhältnis 1 : 1, so leistet die Na-K-Pumpe keinen direkten Beitrag zum Membranpotential, sondern es wird nur über die Aufrechterhaltung der Ionengradienten mitbestimmt. Einen Transportmechanismus, der wie ein Kationenaustauscher arbeitet, bezeichnet man als elektroneutral (z. B. CROSS et al. 1965). Überwiegt der Auswärts-

transport positiver Ladungen aus der Zelle den Einwärtstransport, erzeugt dieser Transportmechanismus einen Strom und liefert einen direkten, elektrogenen hyperpolarisierenden Beitrag zur Höhe des Membranpotentials. Über die Höhe der elektrogen aufgebauten Potentialdifferenz besteht jedoch noch Unklarheit. Am Riesenaxon des Tintenfisches ergaben die Untersuchungen ein Überwiegen des aktiven Na-Auswärtstransportes gegenüber dem K-Einwärtstransport (BAKER et al. 1969, SJODIN & BEAUGE 1968a).

Am Vagusnervenpräparat des Kaninchens (RANG & RITCHIE 1968), an Skelettmuskelzellen des Frosches (SJODIN & BEAUGE 1968b), am Froschvorhof (HAAS et al. 1967) sowie an Ventrikelpräparaten des Säugerherzens (PAGE & STORM 1965) fand man ebenfalls ein Kopplungsverhältnis zwischen aktivem Na- und K-Transport >1.

Wurde die Hemmung der Na-K-Pumpe von Herzpräparaten nach einer Konditionierung aufgehoben, so erfolgte ein forcierter Na-Auswärtstransport, der begleitet war von einer vorübergehenden Hyperpolarisation des Membranpotentials oder unter Bedingungen der Spannungsklemme ("voltage clamp") von einem transienten Auswärtsstrom (ISENBERG & TRAUTWEIN 1974, 1975, GADSBY 1980b). Der Auswärtsstrom konnte an Purkinjefasern durch Strophanthidin: 10^{-5} M (EISNER & LEDERER 1980b), Dihydrostrophanthin: (DHO) 10^{-5}M (ISENBERG & TRAUTWEIN 1974) und durch Acetylstrophanthidin: 5×10^{-6}M (GADSBY & CRANEFIELD 1979a) blockiert werden.

Nach Unterkühlungsperioden hyperpolarisierte das Membranpotential von Herzmuskelpräparaten vorübergehend beim Wiedererwärmen (HIRAOKA & HECHT 1973), wobei das berechnete K-Gleichgewichtspotential auch überschritten wurde (PAGE & STORM 1965, GLITSCH 1969),und nach Bespülungsphasen mit K-freier Lösung trat ebenfalls eine transiente Hyperpolarisation der Herzmuskelzellen auf (NOMA & IRISAWA 1975). Diese vorübergehende Zunahme des Membranpotentials wird

auf die Aktivität der Na-K-Pumpe zurückgeführt, denn der aktive Na-Efflux und die Hyperpolarisation werden durch Herzglykoside gehemmt (GLITSCH 1972b, HIRAOKA & HECHT 1973).

Diese Befunde können auf einen elektrogenen Pumpmechanismus hinweisen, doch kann die starke Aktivierung einer elektroneutralen Pumpe die vorübergehende Zunahme des Membranpotentials auch durch eine lokale K-Verarmung ("depletion") an der Membranaußenseite bewirken.

Das E_K wird in negativer Richtung verschoben und ist damit die Ursache für das gemessene negativere Potential. Eine Analyse des Einflusses interzellulärer Spalträume auf die elektrischen Eigenschaften von Purkinjefasern (SCHÖNBERG & FOZZARD 1979) führt zu dem Schluß, daß es bei Faserdurchmessern $\leq$100 µm in den interzellulären Spalträumen durchaus zu einer lokalen K-Verarmung kommen kann.
Diese Problematik wird vergleichend für Skelettmuskelfasern des Frosches und Purkinjefasern des Hundes von GADSBY (1980a) diskutiert. Auch an Skelettmuskelfasern des Frosches kann das Zustandekommen einer lokalen K-Verarmung nicht ausgeschlossen werden.

Durch elektrophysiologische Untersuchungen der K-aktivierten Antwort der Zellen kann die Arbeitsweise der Na-K-Pumpe erfaßt und charakterisiert werden. An Schafspurkinjefasern wurde der elektrogene transiente Na-Pumpstrom unter voltage-clamp Bedingungen bei Reaktivierung der Na-K-Pumpe als Funktion von a^i_{Na} nachgewiesen (EISNER, LEDERER & VAUGHAN-JONES 1981a, b). GADSBY (1980b) zeigte an Hundepurkinjefasern, daß der K-aktivierte Auswärtsstrom proportional der intrazellulären Na-Konzentration ist. Sein Modell geht von der Annahme aus, daß im Fließgleichgewicht der Zelle die Größe des passiven Na-Influx ($-m_{Na}$) gleich dem aktiven Na-Efflux ist und damit Na_i konstant bleibt. In K-freier Lösung ist der aktive Na-Efflux gering oder

gleich Null, und bei konstantem Na-Influx erhöht sich Na_i entsprechend der Verweildauer der Präparate in K-freier Lösung.

1.4 Erfassung der aktiven Na-K-(Rb)-Pumpe mit elektrophysiologischen und optischen Methoden

Mit optischen und elektrophysiologischen Methoden wird in der vorliegenden Arbeit der Ouabain hemmbare Na-K-Transport an Herzmuskelpräparaten untersucht. Die Bestimmung der Na- und K-Fluxe über der Zellmembran lassen aufgrund ermittelter kinetischer Größen Rückschlüsse auf den Transportmechanismus zu.Bestimmungen kinetischer Parameter der Rb-Aufnahme am Arbeitsmyokard des Säugetieres lagen bisher nur für den Zustand des Na_i-Fließgleichgewichtes vor (GLITSCH & PUSCH in: GLITSCH 1979). Es fehlte die kinetische Analyse der Rb-Aufnahme in Na beladene Herzmuskelzellen.

Die elektrophysiologische Untersuchungsmethode der Membranpotentialmessung bei einer K-aktivierten Antwort der Herzmuskelzelle verwendet Änderungen des Membranpotentials als Maß für die Aktivierung der Na-K-Pumpe.

Das Membranpotential einer Myokardzelle ist:

a) im steady state bei Na_i=const. eine Funktion der extrazellulären K-Konzentration (GLITSCH et al. 1978)

b) und zeigt nach experimenteller Na_i-Erhöhung bei Wiederzugabe von K_o (Rb_o) eine transiente Hyperpolarisation (GADSBY & CRANEFIELD 1979a, b; EISNER & LEDERER 1979) bzw. eine zeitabhängige exponentielle Abnahme des Auswärtsstromes unter voltage clamp (EISNER et al. 1979, 1981b).

Die Annahme erscheint gerechtfertigt, daß die Abnahme der Hyperpolarisation korreliert ist mit einer Verringerung von a^i_{Na} (GLITSCH & PUSCH 1980, GLITSCH et al. 1981).

Um das Membranpotential der Herzmuskelzelle als Funktion von K_o und Na_i darzustellen, wurde ein dreidimensionales Diagramm gewählt. Die Abhängigkeit des Membranpotentials von K_o und Na_i wird für den Fall des steady states und für den Fall der Na_i-Beladung der Zellen betrachtet, die Abb. 2 zeigt das Diagramm. Auf der x-Achse ist das Membranpotential in mV, auf der y-Achse ist die Na_i in mMol/l F.W. und auf der z-Achse ist die K_o in mM aufgetragen.

Das Membranpotential hat a) im Fließgleichgewicht der Zelle (●) (K_o = 5 mM; Na_i 20 mMol/l F.W.) einen Wert von -70 mV (Pkt. a_1 in Abb. 2). Wird K_o der Badlösung auf 3 mM verringert, erreicht das Potential bei Na_i=const. einen Wert von etwa -87 mV (Pkt. a_2 in Abb. 2; vgl. Abb. 12). Wird das Membranpotential nach b) experimenteller Erhöhung von Na_i auf etwa 40 mMol/l F.W. bei K_o = 5 mM gemessen, so erreicht das Potential in den ersten Minuten Werte über -90 mV (Pkt.☆) (GLITSCH 1972a). Die Differenz ΔV von etwa 20 mV zwischen maximalem Potential und Ruhemembranpotential bei K_o = 5 mM geht mit der Zeit gegen Null (GLITSCH et al. 1978). Dies nach Na_i-Erhöhung auftretende zusätzliche Membranpotential wird auf eine teilweise elektrogene Na-K-Pumpe zurückgeführt (s. GLITSCH 1979).

Die vorliegende Arbeit beschreibt Untersuchungen der Quabainhemmbaren K- bzw. Rb-Aufnahme in das Vorhofgewebe des Meerschweinchenherzens, wobei die Untersuchungen mit optischen und elektrophysiologischen Methoden durchgeführt wurden. Es wurde eine kinetische Analyse des aktiven K- bzw. Rb-Transportes versucht und die Abhängigkeit der aktiven Rb-Aufnahme in Herzmuskelzellen von der Na_i und Rb_o quantitativ studiert. Ein weiteres Ziel der Untersuchung ist die Beschreibung der

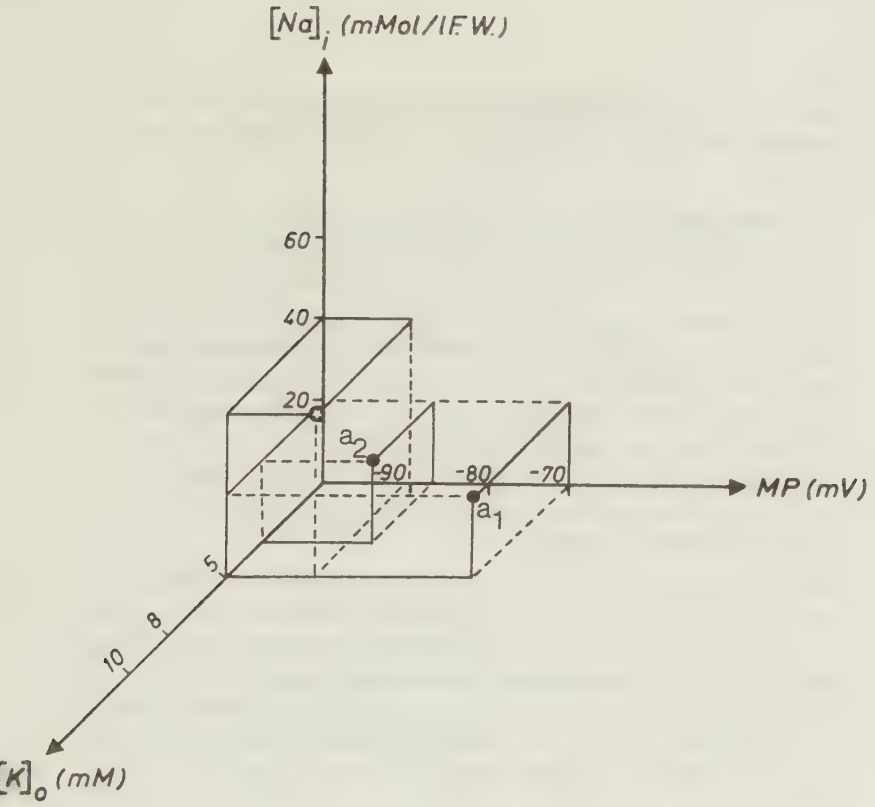


Abb. 2: Dreidimensionale Darstellung des Membranpotentials als Funktion der K_o im Fließgleichgewicht (●) bei a_1 und a_2 konstanter Na_i und nach b) experimenteller Erhöhung von Na_i (☆) direkt nach Beendigung der Konditionierung.

x-Achse: Membranpotential in mV
y-Achse: intrazell. Na-Konzentration in mMol/l F.W.
z-Achse: K-Konzentration in der Badlösung in mM

Der Darstellung liegen z. T. bereits veröffentlichte experimentelle Daten vom Meerschweinchenvorhof zugrunde (GLITSCH 1972a, GLITSCH et al. 1978).

Membranpotentialveränderungen, die an Zellen des Arbeitsmyokards bei Aktivierung des aktiven Na-K-Transports auftreten.

Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgt nach dem mathematischen Modell von GADSBY (1980b), das für Zellen des Reizleitungsgewebes aufgestellt wurde.

Es wird überprüft, ob das Modell des aktiven Na-K-Transportes, das einen elektrogenen Beitrag zum Membranpotential impliziert, für Zellen des Arbeitsmyokards Gültigkeit besitzt. Analog dem exponentiellen Abfall des Auswärtsstromes bei Reaktivierung der Na-K-Pumpe wird an Zellen des Arbeitsmyokards ein exponentieller Abfall des Membranpotentials nach einer Konditionierungszeit in K-freier Lösung bei Zugabe von K-Ionen erwartet.

Nach den angewandten Methoden ist eine Gliederung der Darstellung in zwei Hauptteile angebracht. Im ersten Teil wird die Abhängigkeit der Ouabain-hemmbaren Kationenaufnahme in Muskelzellen des Meerschweinchenvorhofes von K_o bzw. Rb_o und Na_i dargestellt, im zweiten Teil wird der Verlauf der K-induzierten Änderung des Membranpotentials an Myokardzellen mit erhöhter Na_i untersucht.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden auf dem internationalen Kongreß für physiologische Wissenschaften in Budapest 1980 vorgestellt (GLITSCH & THIELEN 1980).

2. Darlegungen zur theoretischen Analyse

2.1.1 Die Michaelis-Menten-Gleichung

Die Sättigungskinetik einer enzymkatalysierten Reaktion kann nach der Theorie von Michaelis-Menten analysiert werden (s. LEHNINGER 1970).

Eine enzymkatalysierte Reaktion wird durch folgende Darstellung beschrieben:

$$[E] + [S] \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [ES] \qquad 2.1.1.1$$

$$[ES] \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} [E] + [P] \qquad 2.1.1.2$$

[E] = Enzymkonzentration
[S] = Substratkonzentration
[ES] = Konzentration an Enzym-Substratkomplex
[(E-ES)] = Konzentration an freiem Enzym
[P] = Produktkonzentration
$k_1 \ldots k_4$ = spezifische Geschwindigkeitskonstanten

Das Enzym E formt mit dem Substrat S einen Enzym-Substrat-Komplex ES, der in einem weiteren Reaktionsschritt in das Produkt P und das freie Enzym zerfällt. Die Reaktionen sind reversibel, und die Bildung des ES-Komplexes ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion. Unter der Voraussetzung des Substratüberschusses ist die Menge an gebundenem Substrat vernachlässigbar klein gegenüber der Konzentration an Gesamtsubstrat.

Die Geschwindigkeit der Bildung von ES ist gegeben durch:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[(E-ES)] \cdot [S] \qquad 2.1.1.3$$

Die Geschwindigkeit der Umsetzung von ES ist gegeben durch:

$$\frac{-d[ES]}{dt} = k_2\,[ES]+k_3\,[ES] \qquad 2.1.1.4$$

bei vernachlässigbar kleiner Rückreaktion:

$$[E\,] + [P] \xrightarrow{k_4} [ES] \qquad 2.1.1.5$$

Stehen die Bildung und der Zerfall des Komplexes im Gleichgewicht, so gilt:

$$k_1\,([E]-[ES]) \cdot [S] = k_2[ES] + k_3[ES] \qquad 2.1.1.6$$

Durch Umformung erhält man:

$$\frac{[S]\cdot([E]-[ES])}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m \qquad 2.1.1.7$$

K_m wird als Michaelis-Menten-Konstante bezeichnet (s. z. B. LEHNINGER 1970).

Die steady-state Konzentration des ES-Komplexes erhält man durch Auflösen der Gl. 2.1.1.7 nach [ES]:

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{K_m + [S]} \qquad 2.1.1.8$$

Ist die Anfangsgeschwindigkeit v einer enzymatischen Reaktion proportional [ES], gilt:

$$v = k_3 \cdot [ES] \qquad 2.1.1.9$$

und bei Substratüberschuß wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} erreicht:

$$v_{max} = k_3 \cdot [ES] \qquad 2.1.1.10$$

Durch Einsetzen von ES in Gl. 2.1.1.8 aus Gl. 2.1.1.9 folgt:

$$v = k_3 \frac{[E] \cdot [S]}{K_m + [S]} \qquad 2.1.1.11$$

Durch Division mit Gl. 2.1.1.10 erhält man:

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{k_3 \cdot \frac{[E] \cdot [S]}{K_m + [S]}}{k_3 [E]} \qquad 2.1.1.12$$

und Auflösung nach v ergibt:

$$v = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]} \qquad 2.1.1.13$$

Die Michaelis-Menten-Gleichung gibt die quantitative Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Substratkonzentration an.

Bei einem Carrier vermittelten Transport handelt es sich um einen der Enzymkatalyse analogen Vorgang (s. Abb. 1), mit der Einschränkung, daß der Carrier-Substrat-Komplex nicht am selben Reaktionsort in Carriermolekül und Produkt zerfällt, sondern eine Translokation durch die Membran durchführt und die Dissoziation an der anderen Membranseite abläuft.

Für den membrangebundenen Carrier C gelten die Voraussetzungen (s. HÖFER 1977):

a) Substratspezifität
b) Bildung eines Carrier-Substrat-Komplexes
c) Permeation des Komplexes durch die Membran
d) Sättigung des Carriers durch das Substrat.

Für die Ermittlung der Transportparameter ist eine weitere Voraussetzung die Bestimmung des unidirektionalen Fluxes, d. h. z. B. beim Messen des Influx muß die Substratkonzentration in der Zelle näherungsweise Null sein.

Angewandt auf die Translokation von Rb mit einem Carriermolekül durch die Zellmembran folgt aus Gl. 2.1.1.7:

$$K_m = \frac{[Rb]_o \cdot ([C]-[CRb])}{[CRb]} \qquad 2.1.1.14$$

[C] = Gesamtkonzentration an Carriermolekülen.
[CRb] = Konzentration an besetzten Carriermolekülen

Analog der Reaktionsgeschwindigkeit v folgt für die aktive Rb-Aufnahme A_{Rb} in Herzmuskelzellen nach Gl. 2.1.1.13:

$$A_{Rb} = \frac{A_{max}\ [Rb]_o}{K_m + [Rb]_o} \qquad 2.1.1.15$$

da für den aktiven Rb-Influx gilt:

$$A_{Rb} = v' \cdot k\ [Rb]_o \qquad 2.1.1.16$$

(vgl. auch Gl. 2.2.1.4)
wobei k [s^{-1}] die Geschwindigkeitskonstante und v' das Zellvolumen ist.

Der Zusammenhang zwischen Flux A und Geschwindigkeit v folgt aus den Gleichungen 2.1.1.9 und 2.1.1.16.

Die Geschwindigkeit ist definiert als Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit, wogegen der Flux die Änderung der Mole pro Zeiteinheit angibt.

Folgende Gleichung zeigt die Verknüpfung beider Größen:

$$\frac{A}{v'} = v \qquad 2.1.1.17$$

2.1.2 Darstellung von Meßdaten nach Lineweaver & Burk

Durch algebraische Umformung kann die Michaelis-Menten-Gleichung in eine graphisch gut auswertbare Form gebracht werden. Die reziproke Form von Gl. 2.1.1.13 lautet:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{v_{max} \cdot [S]} \qquad 2.1.2.1$$

Trennung der Größen der rechten Seite der Gl. ergibt:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{v_{max} \cdot [S]} \qquad 2.1.2.2$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \qquad 2.1.2.3$$

Gleichung 2.1.2.3 ist die Lineweaver & Burk-Gleichung, die bei graphischer Darstellung von 1/S gegen 1/v eine Gerade mit dem Anstieg K_m/v_{max} und dem Schnittpunkt der Ordinate $1/v_{max}$ ergibt.

Aus dieser doppeltreziproken Auftragung können die eine enzymatische Reaktion charakterisierenden Werte K_m und v_{max} leicht ermittelt werden.

2.1.3 Darstellung von Meßdaten nach Eisenthal & Cornish-Bowden

Bei der Transformation der Sättigungsfunktion einer enzymkatalysierten Reaktion nach Eisenthal & Cornish-Bowden (1974) wird der funktionale Zusammenhang der aus Einzeldaten ermittelten v_{max}-Werte und K_m-Werte gezeigt. Ausgehend von der Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 2.1.1.13)

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

erhält man:

$$v \cdot K_m + v \cdot [S] = v_{max} \cdot [S] \qquad 2.1.3.1$$

$$\frac{v \cdot K_m}{[S]} + v = v_{max} \qquad 2.1.3.2$$

Die Umformung:

$$\frac{v}{[S]} \cdot K_m + v = v_{max} \qquad 2.1.3.3$$

macht die Form einer allgemeinen Geradengleichung $y = mx+b$ deutlich. Hierbei ist K_m die unabhängige ($x = K_m$) und v_{max} ($y = v_{max}$) die abhängige Variable.

Zur Konstruktion des entsprechenden Graphen wird die Substratkonzentration S an der Ordinate gespiegelt aufgetragen, und die Geraden werden mit Hilfe der Koordinatenschnittpunkte v und -S jedes Wertepaares eingezeichnet. Die Steigung der

Geraden ist gegeben durch v/S, der Ordinatenabschnitt durch v. Jedes Wertepaar ergibt eine Gerade, im Idealfall haben alle Geraden einen Schnittpunkt mit den Koordinaten $\bar{K}_m$ und $\bar{v}_{max}$.

Aufgrund der Streuung experimenteller Daten erhält man bei der graphischen Auftragung von Meßdaten in der Regel statt eines einzigen Schnittpunktes eine Schar von Schnittpunkten. Der Vorteil der Auftragung im direkten linearen Diagramm liegt in der gleich starken Wichtung aller Meßwerte, in der einfachen Bestimmung der Mittelwerte und der Möglichkeit, diejenigen Werte, die mit großen Fehlern behaftet sind, leicht zu erkennen.

2.1.4 Abschätzung von Substratbindungsstellen: Das Hill-Diagramm

Enzyme können aus mehreren Untereinheiten bestehen, die unabhängig voneinander mit Substratmolekülen besetzt werden. Bei der Auftragung der ermittelten Reaktionsgeschwindigkeit in einem Diagramm als Funktion der Substratkonzentration ergibt sich ein Kurvenverlauf, der durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben wird. Bei allosterischen Enzymen liegen verschiedene Proteinuntereinheiten vor, wobei die Besetzung einer Untereinheit mit einem Substratmolekül die Besetzung der nächsten durch Erhöhung der Affinität erleichtert. Dieses Verhalten wird Kooperativität der Bindungen genannt und ergibt bei der Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration einen sigmoiden Kurvenverlauf (s. SEGEL 1976). Bei doppeltreziproker Auftragung von v gegen S in einem Diagramm (LINEWEAVER & BURK) wird die Kooperativität der Bindungsstellen aus dem Abweichen des Kurvenverlaufes von einer Geraden deutlich (s. KOTYK 1977).

Bei einem Enzym mit n äquivalenten Substratbindungsstellen und ausgeprägter Kooperativität der Bindungsstellen ist die Konzentration des Enzym-Substratkomplexes mit weniger als n- Substratmolekülen bei jeder Substratkonzentration S vernachlässigbar klein. Unter dieser Voraussetzung wird die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt durch $[S]^n$ (s. SEGEL 1976). Den mathematischen Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration beschreibt die Hill-Gleichung:

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[S]^n}{K'+[S]^n} \qquad 2.1.4.1$$

n = Anzahl der Substratbindungsstellen pro Enzymmolekül
[S] = Substratkonzentration
K' = spezifische Konstante, die die Wechselwirkung der einzelnen Bindungsstellen und deren Dissoziationskonstanten enthält.

Zur graphischen Ermittlung von n wird die Hill-Gleichung in eine lineare Form gebracht:

$$v_{max} \cdot [S]^n = v \cdot K' + [S]^n \cdot v \qquad 2.1.4.2$$

$$(v_{max}-v) \cdot [S]^n = v \cdot K' \qquad 2.1.4.3$$

$$\frac{(v_{max}-v) \cdot [S]^n}{v} = K' \qquad 2.1.4.4$$

$$n \ln[S] + \ln\frac{v_{max}-v}{v} = \ln K' \qquad 2.1.4.5$$

$$\ln\frac{v_{max}-v}{v} = \ln K' - n \ln[S] \qquad 2.1.4.6$$

$$\ln\frac{v}{v_{max}-v} = n \ln[S] - \ln K' \qquad 2.1.4.7$$

Trägt man ln (v / v_{max}-v) gegen ln S auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung n und dem Ordinatenabschnitt ln K'.

Ist die Kooperativität der einzelnen Bindungsstellen nicht sehr groß, so gibt n nicht die Anzahl der Bindungsstellen wieder, sondern wird als Hill-Koeffizient h bezeichnet, der ein qualitatives Maß ist für die Stärke der Kooperativität. Zum Beispiel kann ein Hill-Koeffizient von h = 1.8 auf zwei Bindungsstellen mit relativ starker Kooperativität hinweisen,oder auf vier Substratbindungsstellen mit schwacher Kooperativität (s. SEGEL 1976). Geht man davon aus, daß ein Carrier vermittelter Transport durch eine Enzymkinetik beschrieben werden kann, so kann durch eine Hill-Analyse die Anzahl der Bindungsstellen am Carriermolekül abgeschätzt werden (vgl. NELSON & BLAUSTEIN 1980).

2.2 Theoretische Grundlagen zur quantitativen Erfassung der K-aktivierten Zellantwort

Die theoretischen Überlegungen ergeben, daß das Modell, wie es von GADSBY (1980b) zur Beschreibung der K-aktivierten Membranantwort aufgrund von Strommessungen aufgestellt wurde, auch zur Analyse der Hyperpolarisation des Membranpotentials nach Konditionierung der Präparate geeignet ist.

2.2.1 Das Modell zur Beschreibung des K-aktivierten Membranstromes

Die direkte Messung des transmembranären Stromes an geeigneten Präparaten unter Bedingungen der Spannungsklemme erfaßt den elektrogenen Beitrag der Na-K-Pumpe (GADSBY 1980b). Der Na-Pumpstrom I_p ist direkt proportional der Differenz

zwischen aktivem Na-Efflux A_{Na} und K-Influx A_K, so daß gilt:

$$I_p = F\,(A_{Na} + A_K) \qquad 2.2.1.1$$

wobei F die Faraday-Konstante ist und der Kationenefflux positiv definiert ist.

Unter der Voraussetzung, daß das Verhältnis (r) von aktivem Na-Efflux und aktivem K-Influx unabhängig von Na_i und K_o ist, gilt:

$$r = -A_{Na}/A_K \qquad 2.2.1.2$$

und für den Pumpstrom I_p folgt durch Einsetzen in 2.2.1.1.:

$$I_p = A_{Na} F\,(1 - \frac{1}{r}) \qquad 2.2.1.3$$

Der aktive Na-Efflux wird als Funktion von Na_i angenommen, es gilt:

$$A_{Na} = v'k \cdot Na_i \qquad 2.2.1.4$$

wobei v' das zelluläre Volumen und k die K_o abhängige Geschwindigkeitskonstante des Na-Auswärtstransports darstellt. Na_i wird bestimmt durch den aktiven Na-Efflux (positiv) und den passiven Na-Influx ($-m_{Na}$), es folgt daher für die zeitabhängige Änderung von Na_i:

$$\frac{dNa_i}{dt} = \frac{-(m_{Na} + A_{Na})}{v'} \qquad 2.2.1.5$$

und im steady state der Zelle ist:

$$-m_{Na} = v' \cdot k \cdot Na_i \quad (\infty) \qquad 2.2.1.6$$

wobei Na_i (∞) die Na_i des steady state darstellt und

$$\frac{dNa_i}{dt} = 0 \qquad 2.2.1.7$$

ist.
Wird der passive Na-Influx als konstant angenommen, ergibt sich durch Einsetzen von 2.2.1.4 und 2.2.1.6 in 2.2.1.5:

$$\frac{dNa_i}{dt} = -k\ (Na_i - Na_i(\infty)) \qquad 2.2.1.8$$

In K-freier Lösung wird die Geschwindigkeitskonstante k vernachlässigbar klein und der aktive Na-Efflux wird null. Aus der Zeitdauer t_1 der Bespülung mit K-freier Lösung resultiert ein Anstieg der Na_i:

$$\triangle Na_i = \frac{-m_{Na} \cdot t_1}{v'} \qquad 2.2.1.9$$

und bei Reaktivierung des aktiven Na-Efflux durch K-haltige Tyrodelösung gilt für die zeitabhängige Größe Na_i (t) die Lösung der Differentialgleichung 2.2.1.8:

$$Na_i(t) = Na_i\ (\infty) + \triangle Na_i \cdot e^{-kt} \qquad 2.2.1.10$$

Na_i nimmt also bei der K-aktivierten Antwort exponentiell ab. Für den Pumpstrom folgt aus Gl. 2.2.1.3 und 2.2.1.4:

$$Ip = F\ (1-\frac{1}{r})v' \cdot k \cdot Na_i(t) \qquad 2.2.1.11$$

und im steady state der Zelle gilt:

$$Na_i = Na_i\ (\infty) \qquad 2.2.1.12$$

Daraus folgt für den Pumpstrom im steady state:

$$Ip(\infty) = F(1-\frac{1}{r})v' \cdot k \cdot Na_i(\infty) \qquad 2.2.1.13$$

Aus Gl. 2.2.1.10, 2.2.1.11 und 2.2.1.13 folgt für die Differenz des Pumpstromes aufgrund der K-aktivierten Antwort:

$$\Delta Ip = Ip - Ip(\infty) \qquad 2.2.1.14$$

$$= F(1-\frac{1}{r})v' \cdot k \cdot \Delta Na_i e^{-kt} \qquad 2.2.1.15$$

Die Gleichung 2.2.1.15 zeigt den exponentiellen Abfall des Pumpstromes mit der Geschwindigkeitskonstanten k.

Den K-aktivierten Pumpstrom konnte GADSBY (1980b) an Hundepurkinjefasern messen und die Zeitkonstante τ (= 1/k) des exponentiellen Abfalls bestimmen.

Die ermittelten Zeitkonstanten liefern ein Maß des K-aktivierten Auswärtsstromes und gestatten unter der Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik die Berechnung derjenigen K_o, bei der der Pumpstrom halbmaximal ist.

2.2.2 Das Modell zur Beschreibung der K-aktivierten Hyperpolarisation

An Arbeitsmyokardzellen des Säugetieres kann aus methodischen Gründen eine direkte Messung des Pumpstromes bei Aktivierung der Na-K-Pumpe nicht erfolgen. In dieser Arbeit dient die Hyperpolarisation des Membranpotentials nach einer K-freien Konditionierungsphase während der K-aktivierten Antwort bei kontinuierlicher Registrierung zur Erfassung eines Beitrags der herzglykosidhemmbaren Na-K-Pumpe zum Membranpotential.

Ein Modell der Na-K-Pumpe, dem die Analyse der Hyperpolarisation des Membranpotentials zugrunde liegt, wurde für das Vagusnervenpräparat des Kaninchens aufgestellt (RANG & RITCHIE 1968).

Dabei geben die Autoren für die elektrogen transportierte Ladungsmenge Q, die während des transienten Pumpstromes über die Membran fließt, folgende Gleichung an:

$$Q = G_m \int \Delta V \, dt \qquad 2.2.2.1$$

wobei G_m (= $1/R_m$) die Membranleitfähigkeit und ΔV die Hyperpolarisation darstellt.

Weiter gilt:

$$Q = \int \Delta Ip \, dt \qquad 2.2.2.2$$

daraus folgt:

$$G_m \int \Delta V \, dt = \int \Delta Ip \, dt \qquad 2.2.2.3$$

Es gilt:

$$\Delta Ip = G_m \cdot \Delta V \qquad 2.2.2.4$$

$$\Longrightarrow \frac{1}{G_m} \cdot \Delta Ip = \Delta V \qquad 2.2.2.5$$

Aus Gl. 2.2.1.15 zusammen mit Gl. 2.2.2.5 folgt für die Hyperpolarisation ΔV:

$$\Delta V = \frac{1}{G_m} \cdot F\left(1-\frac{1}{r}\right) \cdot v' \cdot k \cdot \Delta Na_i e^{-kt} \qquad 2.2.2.6$$

Durch Logarithmieren erhält man:

$$\ln \Delta V = \ln[\frac{1}{G_m} \cdot F(1-\frac{1}{r}) \cdot v' k . \Delta Na_i] - kt \qquad 2.2.2.7$$

Bei der Auftragung des Logarithmus von ΔV gegen die Zeit t ergibt sich eine Gerade mit der Steigung -k. Bei konstanter K_o ist k damit ein Maß zur Beschreibung eines Beitrages der Na-K-Pumpe zum Membranpotential unter der Voraussetzung einer konstanten Membranleitfähigkeit.

In den Experimenten am Arbeitsmyokard des Meerschweinchenherzens wird die exponentielle Abnahme der K-aktivierten Zellantwort nachgewiesen und die Zeitkonstante $\tau = 1/k$ ermittelt. Die Hemmung der Hyperpolarisation nach Konditionierung der Präparate bei Zugabe K-haltiger Lösungen mit DHO (10^{-4} M) wird gezeigt.

2.2.3 Ableitung der Zeitkonstanten τ als Funktion von K_o

Aus Gl. 2.2.2.7 geht hervor, daß bei konstanter K_o die Zeitkonstante τ ein Maß der K-aktivierten Hyperpolarisation darstellt.

Die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion beschreibt die Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 2.1.1.13), nimmt man den aktiven Na-Efflux als Funktion von K_o an, so gilt:

$$\frac{\Delta Na_i}{\Delta t} = \frac{\frac{\Delta Na_{i\ max}}{\Delta t} \cdot [K]_o}{K_m + [K]_o} \qquad 2.2.3.1$$

für kleine Zeitintervalle Δt.

$\frac{\Delta Na_{i\ max}}{\Delta t}$ ist die maximale Änderung von Na_i, die durch K_o erreicht werden kann, wobei $K_o \gg K_m$.

Für eine von Na_i abhängige Änderung gilt:

$$\frac{\Delta Na_i}{\Delta t} = k \cdot Na_i \qquad 2.2.3.2$$

daraus folgt für die maximale Änderung entsprechend:

$$\frac{\Delta Na_{i\ max}}{\Delta t} = k_{max} \cdot Na_i \qquad 2.2.3.3$$

Unter der Bedingung einer konstanten Konditionierung der Präparate in K-freier Lösung hat Na_i zum Zeitpunkt t = o einen definierten Wert Na_{ix}. Durch Einsetzen von Gleichung 2.2.3.3 und 2.2.3.2 in Gl. 2.2.3.1 ergibt sich:

$$k \cdot Na_{ix} = \frac{(k_{max} \cdot Na_{ix}) \cdot [K]_o}{K_m + [K]_o} \qquad 2.2.3.4$$

$$k = \frac{k_{max} \cdot [K]_o}{K_m + [K]_o} \qquad 2.2.3.5$$

Die Gl. 2.2.3.5 stellt den mathematischen Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeitskonstanten k und K_o her. Mit $k = 1/\tau$ und $k_{max} = 1/\tau$ max gilt:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{\frac{1}{\tau max} \cdot [K]_o}{K_m + [K]_o} \qquad 2.2.3.6$$

Durch die Auftragung von τ als Funktion von $1/K_o$ kann die Halbsättigungskonstante K_{me} der K-induzierten Hyperpolarisation am Arbeitsmyokard des Meerschweinchenherzens ermittelt werden.

2.2.4 Die Geschwindigkeitskonstante k zur Abschätzung der Substratbindungsstellen: der Hill-Koeffizient

Bei der Reaktivierung der Na-K-Pumpe nach der Zeit t_1 verringert sich Na_i entsprechend einer Exponentialfunktion (Gl. 2.2.1.10), und die gemessene Hyperpolarisation ΔV wird bei konstanter K_o durch die Geschwindigkeitskonstante k (Gl. 2.2.2.6) beschrieben.

Aus der Gleichung 2.2.3.5 folgt:

$$\frac{k}{k_{max}} = \frac{[K]_o}{K_m + [K]_o} \qquad 2.2.4.1$$

Gelten die Voraussetzungen der Sättigungskinetik, so folgt für die Hill-Gleichung (s. Gl. 2.1.4.1):

$$\frac{k}{k_{max}} = \frac{[K]_o^n}{K' + [K]_o^n} \qquad 2.2.4.2$$

wobei k eine Information über die Anzahl der K-Bindungsstellen am Carriermolekül liefert.

3. Methodik

Die in Versuchsserie I und II verwendeten Lösungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

3.1 Präparation

Meerschweinchen beiderlei Geschlechts wurden durch Genickschlag getötet und aus den Halsgefäßen entblutet. Der Brustraum wurde mit einer Schere eröffnet und das Herz mit kurzen Stücken der großen Gefäße herauspräpariert. Das Abtrennen der Vorhöfe von den Kammern sowie die weitere Präparation der Vorhöfe und der Trabekel aus dem linken Vorhof erfolgte bei Raumtemperatur (T 20° C) in einer mit Standardtyrodelösung (s. Tab. 1) gefüllten Petrischale. Die Tyrodelösung wurde ständig mit Sauerstoff durchperlt, der pH-Wert der Lösung war mit conc. HCl auf 7.4 eingestellt.

Für die Versuchsserie I wurden rechter und linker Vorhof zusammenhängend verwendet. In der Versuchsserie II dienten isolierte Trabekel aus dem linken Meerschweinchenvorhof als Präparat, da sie in der Regel keine Spontanaktivität zeigen und dadurch für intrazelluläre Messungen mit Mikroelektroden geeignet sind. Die Trabekel wurden unter dem Binokular mit einer Augenschere aus dem Vorhof herauspräpariert. Dazu wurde der Vorhof zunächst in einer mit Sylgard^{R} ausgegossenen Petrischale durch Insektennadeln fixiert und an den Rändern aufgeschnitten. Im linken Vorhof des Meerschweinchenherzens verlaufen Trabekel nur über kurze Strekken frei, daher konnten nur kurze Muskelstückchen präpariert werden. Ein solches Trabekelpräparat hatte etwa eine Länge von 3 bis 5 mm, einen Durchmesser von 0.4 - 0.8 mm und ein Feuchtgewicht von ~1 mg. Es wurde an beiden Enden mit Seidenfäden angeschlungen und konnte so in die Meßkammer transportiert und dort fixiert werden.

Tab. 1: Versuchsserie I und II:

Zusammensetzung der Lösungen (mM)

		NaCl	TRIS	KCl	RbCl	$CaCl_2$	$MgCl_2$	Gluc.
Standard-Tyrodelösung		145	5.0	5.4	---	1.8	1.05	5.0
I A	Unterkühlungslösung	145	5.0	1.35	---	1.8	1.05	5.0
	KCl-haltige Lösung zum Wiedererwärmen	145	5.0	0.67 1.35 2.7 5.4	---	1.8	1.05	5.0
	RbCl-haltige Lösung zum Wiedererwärmen	145	5.0	---	0.67 1.35 2.7 5.4 10.8	1.8	1.05	5.0
I B	Unterkühlungslösung	0	150	1.35	---	1.8	1.05	5.0
	NaCl-haltige Lösung zum Wiedererwärmen	36.3	108.8	---	1.35	0.23	1.05	5.0
		72.5	72.5	---	1.35	0.45	1.05	5.0
		108.8	36.3	---	1.35	0.68	1.05	5.0
		145.0	5.0	---	1.35	1.8	1.05	5.0

TRIS= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

3.2 Versuchsablauf der Versuchsserie I

3.2.1 Serie I A: K^+- bzw. Rb^+-Aufnahme in Vorhofpräparate als Funktion der K_o bzw. Rb_o

Die Vorhofpräparate wurden 30 Minuten in Standardtyrodelösung mit K_o = 5.4 mM bei 34° C äquilibriert. In einer Versuchsreihe Ziff. 4.1.1 wurde von Zellen im Fließgleichgewicht die Na_i, K_i sowie die Rb-Aufnahme Ziff. 4.1.2 nach der Äquilibrierungszeit von 30 Minuten bestimmt.

Zur Na-Beladung und K-Verarmung der Zellen Ziff. 4.1.3 (Schema des Versuchsablaufs Abb. 3) wurden die Präparate 3 3/4 Stunden bei T = 6° C und K_o = 1.35 mM unterkühlt. Zum Austausch des Extrazellulärraumes wurden die Präparate 15 Minuten in der Kälte in der zum Wiedererwärmen verwendeten Lösung mit unterschiedlichen KCl bzw. RbCl-Konzentrationen äquilibriert (s. Tab. 1) und anschließend 15 Minuten wiedererwärmt.

Bei einem Teil der Präparate enthielt die zum Äquilibrieren in der Kälte und zum Wiedererwärmen verwendete Tyrodelösung zusätzlich 10^{-4}M g-Strophanthin (Ouabain) der Firma MERCK (MG 584.67). Die Präparate wurden ebenfalls 15 Minuten in der jeweiligen Lösung mit unterschiedlichen KCl- bzw. RbCl-Konzentrationen wiedererwärmt. Alle Präparate wurden anschließend zur Ermittlung des Feuchtgewichtes gewogen und für die feuchte Veraschung vorbereitet.

Abb. 3: Schema des Versuchsablaufs der Serie I A
in der Schreibweise bedeutet 1.35 K = 1.35 mM KCl,
analog gilt dies für Rb-Konzentrationsangaben

Vorhofpräparate

T °C		
34	30 Min. Äquilibrierung in Standardtyrodelösung	
6	3 3/4 Stunden Unterkühlung in Tyrodelösung mit K_o = 1.35	
6	15 Min. Äquilibrierung in x KCl oder x RbCl Tyrodelösung	15 Min. Äquilibrierung in x KCl oder x RbCL Tyrodelösung mit 10^{-4} M Ouabain
34	15 Min. Wiedererwärmen in x KCl oder x RbCl Tyrodelösung	15 Min. Wiedererwärmen in x KCl oder x RbCl Tyrodelösung mit 10^{-4} M Ouabain

weitere Behandlung: a) Abpressen
b) Trocknen (16 h 100° C)
c) Veraschung (3 h 240° C)

3.2.2 Serie I B: Rb-Aufnahme in Vorhofpräparate als Funktion der Na_i

Für die Bestimmung der Rb-Aufnahme in Abhängigkeit von Na_i wurden die Präparate nach der 30-minütigen Äquilibrierung in Standardtyrodelösung (T 34° C) in Na-freier Lösung mit 150 mM TRIS K_o = 1.35 mM 3 3/4 Stunden bei 6 ° C unterkühlt.

Vor dem Wiedererwärmen der Präparate erfolgte das Äquilibrieren (T 6° C) für 15 Min. in Lösungen mit 25 %, 50 %, 75 % und 100 % NaCl bei 1.35 mM RbCl und verminderter $CaCl_2$-Konzentration (s. Tab. 1) zum Austausch der Lösungen im Extrazellulärraum. Die Präparate wurden anschließend 15 Min. in den jeweiligen Lösungen wiedererwärmt (s. Tab. 1), ein Teil der Präparate in Lösungen mit 10^{-4} M Ouabain. Danach wurden die Präparate standardisiert abgepreßt (300 g, 1 Min.), gewogen und für die feuchte Veraschung vorbereitet.

Die Abb. 4 zeigt das Schema des Versuchsablaufs.

Für beide Versuchsserien I A und I B war die weitere Behandlung zur Bestimmung der Kationenkonzentrationen identisch. Nach dem Abpressen der Präparate zwischen Filterpapier wurden die Vorhöfe zur Ermittlung des Feuchtgewichtes gewogen. Über 16 Stunden erfolgte die Trocknung bei 100° C in temperaturbeständigen Reagenzgläsern. Danach wurde das Trockengewicht festgestellt und die feuchte Veraschung der Präparate durch Zugabe von 0.4 ml Veraschungsgemisch (conc. HNO_3 + 70 % $HClO_4$ im Verhältnis 1 : 1) in die Reagenzgläser eingeleitet. Die Veraschung der Präparate erfolgte innerhalb von 3 Stunden bei 240° C, der Rückstand wurde in 1 ml 0.1 n HCl aufgenommen.

Abb. 4: Schema des Versuchsablaufs der Serie I B
In der Schreibweise bedeutet x NaCl = x mM NaCl, analog gilt dies für die Rb-Konzentrationsangaben

T °C		
	Vorhofpräparate	
34	30 Min. Äquilibrierung in Standard-Tyrodelösung	
6	3 3/4 Stunden Unterkühlung in Na-freier 150 mM TRIS Tyrodelösung K_o = 1.35 mM	
6	15 Min. Äquilibrierung in x NaCl 1.35 Rb_o Tyrodelösung	15 Min. Äquilibrierung in x NaCl 1.35 Rb_o Tyrodelösung mit 10^{-4} M Ouabain
34	15 Min. Wiedererwärmen in x NaCl 1.35 Rb_o Tyrodelösung	15 Min. Wiedererwärmen in x NaCl 1.35 Rb_o Tyrodelösung mit 10^{-4} M Ouabain

Weitere Behandlung: a) Abpressen
b) Trocknen (16 h 100° C)
c) Veraschung (3 h 240° C)

3.2.3 Messung der Kationenkonzentrationen mit optischen Methoden

a) Bestimmung der Konzentration von Na, K und Rb durch Flammenphotometrie

Die Konzentrationen an Na, K und Rb wurden flammenphotometrisch bestimmt (EPPENDORF Flammenphotometer), da sich jedoch die Emmissionsspektren von K und Rb teilweise überlagern (Emmissionsmaximum: K: 769 nm, Rb: 780 nm), war eine Korrektur der Rb-Meßwerte notwendig.

Es wurde eine Eichkurve von RbCl-Konzentrationen aufgenommen (RbCl: 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM), wobei die Eichlösungen zusätzlich 80 mM KCl enthielten. Diese KCl-Konzentration entsprach etwa der K-Konzentration der Präparate nach der Unterkühlungsperiode (s. Tab. 3).

Die Rb-Eichkurven ohne bzw. mit KCl zeigten im untersuchten Konzentrationsbereich denselben Anstieg und verliefen parallel. Die Rb-Eichlösungen mit 80 mM KCl ergaben höhere Meßwerte als die reinen Rb-Lösungen, d. h. die Rb-Meßwerte der Präparate mußten entsprechend verringert werden; in der Tab. 3 sind die korrigierten Meßwerte eingetragen.
Die RbCl-Konzentrationen, die in den experimentellen Lösungen verwendet wurden (0.67 - 10.8 mM),hatten auf die Bestimmung der K-Konzentrationen der Präparate keinen Einfluß.

b) Bestimmung der Rb-Konzentration durch Atom-Absorptions-Spektroskopie

Zusätzlich wurde die Bestimmung der Rb-Konzentration der Präparate am Atom-Absorptions-Spektrometer (AAS) (PERKIN ELMER 272) kontrolliert.

Das Prinzip der Atom-Absorptions-Spektroskopie besteht in der Messung einer Absorption von Lichtenergie durch Atome. Dabei wird Licht der für das zu untersuchende Element spezifischen Wellenlänge durch eine Flamme gestrahlt und die konzentrationsabhängige Absorption gemessen. Das zu untersuchende Element wird durch eine feine Düse als Lösung in die Flamme gesprüht. Da die Atome eines Elementes nur Licht in einem sehr engen Frequenzintervall absorbieren, werden bei der Atom-Absorptions-Spektroskopie spezielle Lampen als Lichtquellen verwendet, die das Spektrum des zu bestimmenden Elementes aussenden. Der Vorteil dieser Meßmethode liegt im Fehlen störender Überlagerungen durch andere in der Probe enthaltene Elemente. Eine detaillierte Beschreibung der Atom-Absorptions-Spektroskopie sowie Angaben zu speziellen Fragestellungen der Methode liefert die Monographie von WELZ (1975).

3.2.4 Berechnung der Kationenkonzentrationen

Die Berechnung der Na_i, K_i und Rb_i-Konzentrationen der Präparate erfolgte nach der von GLITSCH (1969) beschriebenen Methode. Die Größe des Extrazellulärraumes wurde bei T 34°C mit 35%, bei T 6°C mit 30% des Feuchtgewichtes aufgrund der Inulinraumbestimmung angenommen (vgl. GLITSCH 1969). Die Annahmen zur Größe des Extrazellulärraumes bedingen die Schwierigkeit, mit dieser Methode eine eindeutige Berechnung des passiven K-Influx durchzuführen. Die Differenzen der K-Meßwerte zwischen Ouabain vergifteten und nicht vergifteten Präparaten sind für diese Berechnungen zu gering (vgl. Tab. 3 und 4).

3.2.5 Berechnung der passiven und aktiven K-(Rb)-Aufnahme

Die aktive K- bzw. Rb-Aufnahme in die Herzmuskelzellen wurde aus der Differenz zwischen den K- oder Rb-Konzentrationen der Präparate, die ohne bzw. mit 10^{-4} M Ouabain wiedererwärmt worden waren, errechnet. Der passive Anteil des Rb-Influx bei unterschiedlichen Rb_o wurde aus dem Rb-Gehalt der Präparate direkt nach der Unterkühlungsperiode und nach 15 Min. Wiedererwärmen bei T 34° C in Ouabain-haltiger Lösung errechnet.

Die intrazellulären Na-Konzentrationen der Präparate der Versuchsserie I B wurden als Mittelwerte aus den Anfangskonzentrationen vor dem Wiedererwärmen und den Konzentrationen am Ende des Wiedererwärmens berechnet. Bei der Berechnung wurden beide Konzentrationswerte addiert und durch 2 dividiert, damit ist die mittlere Na-Konzentration auf eine Zeit von 7.5 Min. nach Beginn des Wiedererwärmens der Präparate extrapoliert. Die starke Beeinflussung der aktiven Rb-Aufnahme im niedrigen Konzentrationsbereich durch Na_i begründet dieses Auswerteverfahren. Für die Bestimmung der Ouabain hemmbaren Rb-Aufnahme resultiert eine genauere Erfassung der Abhängigkeit von Na_i.

3.3 Versuchsablauf der Versuchsserie II

3.3.1 Kontinuierliche intrazelluläre Messung der K-aktivierten Membranpotentialänderung an Trabekelpräparaten

Die Herstellung der Trabekelpräparate ist unter Ziff. 3.1 beschrieben; sie wurden vor Versuchsbeginn 30 Min. in Standardtyrodelösung (s. Tab. 1) äquilibriert (T 34° C).

Am Versuchsbeginn stand jeweils die Registrierung des Membranpotentials in Tyrodelösung mit 5.4 mM K_o, danach wurden die Präparate für unterschiedliche Zeiträume mit K-freier Lösung bespült. Bei Lösungswechseln reagierte das Potential der Präparate innerhalb von 10 Sekunden auf die Änderung der K-Konzentration in der Badlösung.

Für die Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Membranpotentialänderung und Herzglykosidkonzentration wurden die Präparate mit Dihydro-g-strophanthin (= DHO) (Fa. BOEHRINGER, MG 610) -haltigen Tyrodelösungen (10^{-6} M bis 10^{-4} M) äquilibriert. DHO wurde in den Experimenten verwendet, wegen der guten Reversibilität seiner Wirkung. Die unterschiedlichen DHO-Konzentrationen der Tyrodelösungen wurden aus einer wässrigen 10^{-2} M DHO-Stammlösung hergestellt.

3.3.1.1 Meßplatzaufbau

Das Organbad hatte ein Volumen von 1 ml, ein vollständiger Austausch der Badlösung erfolgte innerhalb von 30 Sekunden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 10 ml Lösung pro Min. Diese Größen wurden unter optischer Kontrolle mit Kaliumpermanganat-haltiger Lösung ermittelt.

Das Trabekelpräparat wurde parallel zur Durchflußrichtung der Lösung im Organbad fixiert. Die Tyrodelösungen flossen aus Vorratsgefäßen in Silikonschläuchen durch temperierte Wasserbäder in das Organbad. Ein Dreiwegehahn mit Anschlüssen für den gleichzeitigen Durchfluß von drei Lösungen erlaubte einen Lösungswechsel mit bereits fließenden Lösungen. Ein seitlich am Lösungszufluß im Organbad angebrachter Thermistor gewährleistete die ständige Kontrolle der Badtemperatur. Beim Umschalten von einer kalten (T 6° C) Lösung auf

eine warme (T 34° C) stieg die Temperatur im Organbad allerdings innerhalb von 1oo Sekunden auf 34°C an.

3.3.1.2 Messung des Membranpotentials durch intrazelluläre Mikroelektroden

Die intrazelluläre Messung des Membranpotentials erfolgte differentiell mit Glasmikroelektroden, die mit 2 M KCl gefüllt waren. Sie wurden mit einem elektrisch angetriebenen Mikromanipulator in die Zellen eingestochen. Der Einstich erfolgte unter optischer Kontrolle durch ein Binokular. Die Spitzen der Mikroelektroden hatten Durchmesser von ≤1.0 µm, als Referenzelektrode im Organbad diente eine zweite Glasmikroelektrode.

Das Membranpotential wurde mit einem Kathodenstrahloszillographen (TEKTRONIX 5111) gemessen, vorgeschaltet war ein Kathodenfolger (GRASS P 18). Die Registrierung des Membranpotentialverlaufs erfolgte mit einem Schreiber (SCHWARZER Varioskript 443). Das Membranpotential wurde kontinuierlich an einer Vorhofzelle gemessen, die Änderung des Potentials bei Veränderung der K_o konnte dadurch erstmalig zeitlich exakt verfolgt werden.

Durch die fortlaufenden Potentialregistrierungen werden schon geringfügige Änderungen des Membranpotentials meßbar, lange Unterkühlungsperioden (GLITSCH 1969) werden dadurch auch an Arbeitsmyokardzellen zur Untersuchung der Na-K-Pumpe entbehrlich.

Die elektrische Reizung der Präparate erfolgte über ein Reizgerät (GRASS SD 9 stimulator), die gesamte Versuchsapparatur war in einem Faraday-Käfig aufgebaut, um sie gegen elektrische Störsignale abzuschirmen.

3.3.2 Graphische Ermittlung charakteristischer Größen der K-induzierten Hyperpolarisation

Zur Versuchsauswertung wurden die Membranpotentiale aus den geeichten Registrierungen des Schreiberprotokolls abgelesen. Die berechneten Potentialdifferenzen ΔV zu verschiedenen Zeitpunkten der K-aktivierten Antwort sind auf das Ruhemembranpotential in Lösungen mit der jeweils entsprechenden K-Konzentration bezogen. Das Auswerteverfahren zur Bestimmung der Zeitkonstanten der K-induzierten Membranantwort wird am Beispiel der Abb. 15 detailliert beschrieben.

3.4 Statistische Behandlung der Meßwerte

Mittelwerte ($\bar{x}$) werden mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) angegeben; n bezeichnet die Anzahl der Einzelwerte.

Ist in den Abbildungen kein mittlerer Fehler des Mittelwertes angegeben, so handelt es sich um kontinuierliche Einzelmessungen an einem Präparat.

4. Ergebnisse

4.1 Versuchsserie I A: Die aktive K (Rb)-Aufnahme in Meerschweinchenvorhofpräparate

4.1.1 Bestimmung der intrazellulären Na- und K-Konzentration im steady state der Präparate

In einer Meßreihe wurde die intrazelluläre Na- und K-Konzentration von Meerschweinchenvorhofpräparaten im Fließgleichgewicht flammenphotometrisch bestimmt. Diese Meßwerte wurden ermittelt, um Ausgangswerte für die nachfolgenden Versuche zu erhalten und um nachzuweisen, daß die Präparate über lange Experimentierzeiten ihre physiologische Na- und K-Konzentration aufrechterhalten können. Nach Äquilibrierungszeiten von 30 Minuten und 3 Stunden in Standardtyrodelösung ergaben sich die in Tab. 2 aufgeführten Werte.

Tab. 2: Intrazelluläre Na- und K-Konzentration von Meerschweinchenvorhofpräparaten im Fließgleichgewicht in Standardtyrodelösung

Äquilibrierungszeit:		30 Min.	3 Std.
mMol/lF.W.	Na_i:	28.9 ± 6.5	29.2 ± 9.8
		n = 4	n = 2
	K_i:	127.2 ± 2.7	126.1 ± 6.4
		n = 4	n = 2

Aus den Meßwerten der Tab. 2 geht hervor, daß sich die intrazellulären Na- und K-Konzentrationen nach 30 Minuten und nach 3 Stunden nicht signifikant unterscheiden. Daraus folgt eine Konstanz der Na- und K-Verteilung über der Herzmuskelzellmembran unter geeigneten experimentellen Bedingungen über lange Zeit.

4.1.2 Aktive Rb-Aufnahme der Präparate im steady state

In Versuchen an 5 Vorhofpräparaten wurde die aktive Rb-Aufnahme im steady state in einer Äquilibrierungszeit von 15 Minuten bei Na_i = 24.6 ± 0.1 mMol/lF.W. und Rb_o = 2.7 mM zu 0.95 ± 0.01 mM/lF.W. Min. bestimmt. Dies entspricht unter der Annahme eines Extrazellulärraumes von 35 % einer aktiven Rb-Aufnahme von 0.43 x 10^{-9} Mol/mg Feuchtgewicht · Min. Die aktive Rb-Aufnahme unter diesen Versuchsbedingungen gestattet näherungsweise einen Vergleich mit der ^{86}Rb-Aufnahme im steady state am Meerschweinchenvorhof (YAMAMOTO et al. 1979) und ermöglicht so eine Kontrolle der Bestimmungsmethoden. Die Meßwerte zeigen eine gute Übereinstimmung nach beiden Methoden (YAMAMOTO et al. 1979: Rb_o = 2.0 mM; aktive ^{86}Rb-Aufnahme: 0.46 x 10^{-9} Mol/mg Feuchtgewicht·Min.) Mit der flammenphotometrischen Methode fanden GLITSCH & PUSCH (in: GLITSCH 1979) am gleichen Präparat entsprechende Werte (Rb_o = 2.7 mM, Rb-Aufnahme aus der Kinetik berechnet: 0.9 mMol/lF.W. Min.) der aktiven Rb-Aufnahme.

4.1.3 Aktive Rb-Aufnahme als Funktion der extrazellulären Rb-Konzentration nach Konditionierung der Präparate

Der Einfluß der Rb_o auf die aktive Rb-Aufnahme in zuvor unterkühlte Vorhofpräparate wurde untersucht. Tab. 3 gibt die intrazellulären Na-, K- und Rb-Konzentrationen von Meerschweinchenvorhofpräparaten nach 4-stündiger Unterkühlung und anschließendem Wiedererwärmen für 15 Min. bei unterschiedlichen extrazellulären Rb-Konzentrationen wieder (Versuchsablauf s. Schema Abb. 3). Durch die Unterkühlung in K-armer Tyrodelösung (K_o = 1.35 mM) wurde die Na_i bei allen Präparaten unabhängig von der Rb_o auf 62.8 ± 0.6 mMol/lF.W. (n = 9) erhöht. Gegenüber den Werten im Fließgleichgewicht bedeutet dies eine Na_i-Erhöhung um 117 %.

Tab. 3: Intrazelluläre Na-, K- und Rb-Konzentrationen von Meerschweinchenvorhöfen nach Unterkühlung und nach Wiedererwärmen als Funktion von Rb_o

	$[Na]_i$ (mMol/l Faserw.)			$[K]_i$ (mMol/l Faserw.)			$[Rb]_i$ (mMol/l Faserw.)		
(mM)	a)	b)	c)	a)	b)	c)	a)	b)	c)
$[Rb]_o$	6°C	34°C	34°C+Ouab.	6°C	34°C	34°C+Ouab.	6°C	34°C	34°C+Ouab.
0.67	63.9 n=1	37.7±1.9 n=3	49.7±5.0 n=3	77.3 n=1	86.9±2.1 n=3	77.9±4.4 n=3	0 n=1	7.0±0.2 n=3	0 n=3
1.35	64.1±2.0 n=3	44.8±8.3 n=23	51.8±9.7 n=23	80.1±4.8 n=3	85.9±7.9 n=23	75.9±8.1 n=23	0 n=3	15.5±2.5 n=23	0.5±0.1 n=23
2.7	63.0 n=1	42.2±4.9 n=3	57.7±10.4 n=3	80.8 n=1	92.0±3.7 n=3	79.6±6.0 n=3	0 n=1	19.5±0.9 n=3	1.2±0.1 n=3
5.4	61.8±2.1 n=2	36.2±1.8 n=6	50.6±3.3 n=4	97.0±7.4 n=2	88.7±1.6 n=6	86.4±5.1 n=4	0.2±0.1 n=2	33.4±1.2 n=6	4.4±0.2 n=6
10.8	61.0±9.5 n=2	39.3±2.9 n=6	48.1±0.9 n=3	82.3±0.5 n=2	85.3±2.1 n=6	92.1±1.7 n=3	1.2±0.1 n=2	38.8±1.9 n=6	12.0±0.1 n=6

Die mittlere Na_i der Zellen während des Wiedererwärmens wurde extrapoliert aus allen Mittelwerten direkt nach Unterkühlung und am Ende des Wiedererwärmens. Es ergibt sich für alle Rb_o zum Zeitpunkt 7.5 Min. nach Beginn des Wiedererwärmens eine mittlere Na_i von 51.4 $\pm$ 0.96 mMol/lF.W. (n = 9).

Ein Vergleich der Na_i-Konzentrationen der Spalten a) und b) in der Tab. 3 ergibt nur geringe Differenzen zwischen den Meßwerten innerhalb der Spalten, und eine Rb_o abhängige Tendenz der Änderung der Na_i-Konzentrationen ist nicht zu erkennen. Es erscheint daher gerechtfertigt anzunehmen, daß über einen Zeitraum von 15 Min. während des Wiedererwärmens der Präparate eine Na_i vorliegt, die durch das oben erläuterte Verfahren abgeschätzt werden kann.

Die intrazelluläre K-Konzentration ist nach 3 3/4 Stunden Unterkühlung vermindert und erreicht Werte zwischen 77.3 und 97.0 mMol/lF.W. Die Meßwerte der K-Konzentrationen beim Wiedererwärmen der Präparate (Tab. 3, Spalten b u. c) streuen im gleichen Umfang zwischen 75.9 und 92.1 mMol/lF.W.; diese Streuung ist vermutlich auf eine unterschiedliche Qualität der Präparate zurückzuführen.

Im rechten Drittel gibt die Tab. 3 die Rb-Konzentrationen der Vorhofpräparate als Funktion der Rb_o nach Erhöhung der Na_i an. Nach der Äquilibrierungszeit von 15 Min. in kalter Tyrodelösung enthalten die Präparate bei Rb_o $\leq$5.4 mM keine meßbare Rb-Konzentration (Spalte a); im Konzentrationsbereich von 0.67 - 10.8 mM Rb_o nahmen die Präparate beim Wiedererwärmen Rb konzentrationsabhängig auf.

Am Ende der Äquilibrierungszeit bei 34° C enthielten die Ouabain-(10^{-4} M)vergifteten Präparate bei Rb_o zwischen 1.35 und 10.8 mM Rb_i-Konzentrationen zwischen 0.5 $\pm$ 0.1 (n = 23) bzw. 12.0 $\pm$ 0.1 mMol/lF.W (n = 6).

Die Gesamtaufnahme (U_{Rb}) von Rb in wiedererwärmte Vorhofpräparate mit hoher Na_i als Funktion der Rb-Konzentration der Badlösung ist in Abb. 5 dargestellt. Mit steigender Rb-Konzentration im Organbad (Abszisse in mM) nimmt die Rb-Aufnahme (Ordinate U_{Rb} in mMol/lF.W. Min.) in das Vorhofgewebe zu und erreicht bei Rb_o = 10.8 mM einen Wert von 2.59 $\pm$ 0.1 mMol/lF.W. Min. (n = 6), die Ouabain (10^{-4} M) hemmbare (●) und nicht hemmbare (■) Komponente der Rb-Aufnahme ist in Abb. 6 dargestellt. Auf der Ordinate ist die Rb-Aufnahme in mMol/lF.W. Min. (V_{Rb}) aufgetragen, auf der Abszisse die Rb-Badkonzentration in mM. Die Ouabain hemmbare Rb-Aufnahme wurde errechnet aus der Differenz der Rb-Konzentrationen (Tab. 3, Spalten b - c) nach dem Wiedererwärmen der Präparate ohne bzw. mit Ouabain in der Badlösung. Der Kurvenverlauf der Rb-Aufnahme zeigt eine Sättigungscharakteristik im untersuchten Rb_o-Konzentrationsbereich. Bei Rb_o = 0.67 mM wurden 0.47 $\pm$ 0.01 mMol/lF.W. Min. (n = 3) aufgenommen, bei Rb_o = 5.4 mM betrug die Rb-Aufnahme 1.92 $\pm$ 0.06 mMol/lF.W. Min. (n = 6); dies bedeutet eine Vervierfachung der Rb-Aufnahme bei Erhöhung von Rb_o um den Faktor acht.

Die durch Ouabain nicht hemmbare Komponente (■) der Rb-Aufnahme zeigt eine lineare Abhängigkeit von Rb_o und erfolgt höchstwahrscheinlich passiv. Bei Rb_o = 0.67 mM kann nach 15 Min. Äquilibrierungszeit keine Rb-Aufnahme in die Präparate gemessen werden, bei Rb_o = 10.8 mM beträgt die Aufnahme 0.80 $\pm$ 0.01 mMol/lF.W. Min. (n = 2).

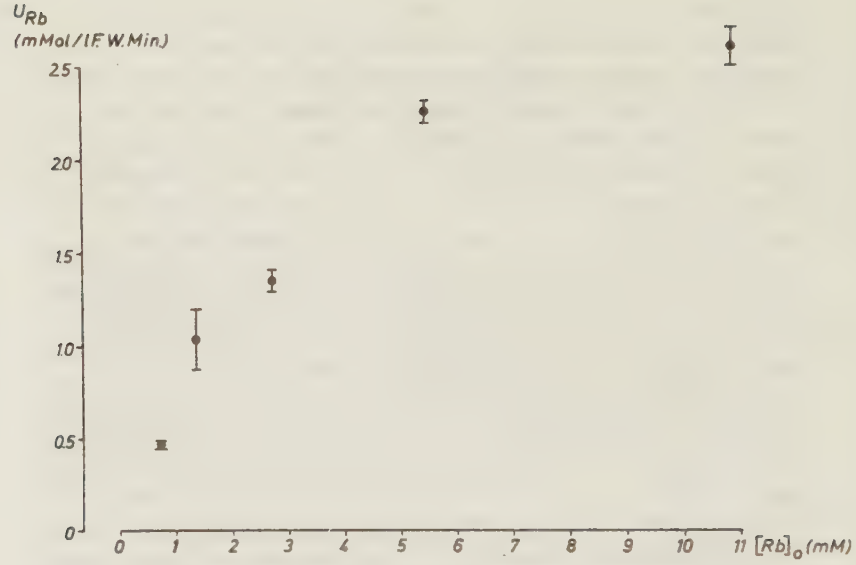


Abb. 5: Rb-Aufnahme (●) in Meerschweinchenvorhof-präparate nach 4 Stunden Unterkühlung (T 6° C) und 15 Minuten Wiedererwärmen (T 34° C) als Funktion der Rb-Konzentration in der Badlösung

Ordinate: Rb-Aufnahme (U_{Rb}) in mMol/lF.W. Min.
Abszisse: Rb-Konzentration der Badlösung in mM

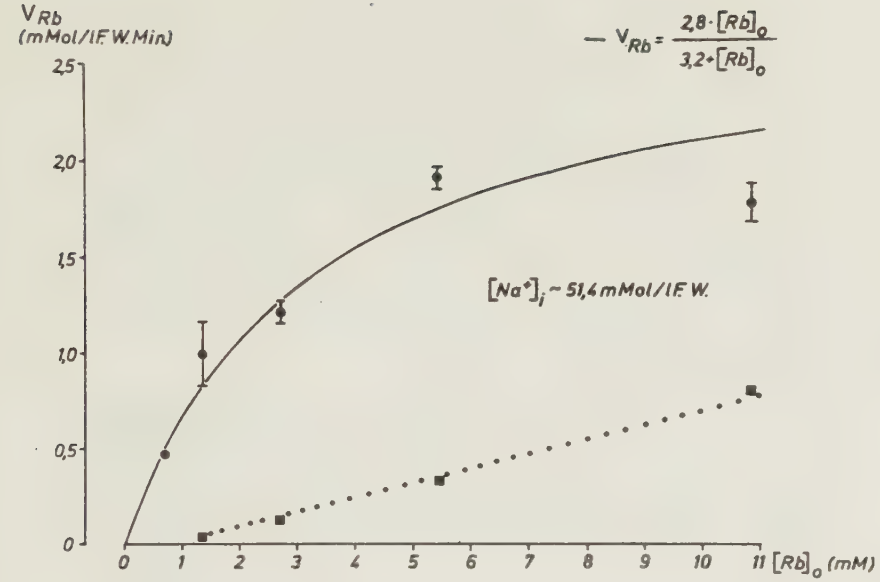


Abb. 6: Ouabain (10^{-4} M) hemmbare (●) und nicht hemmbare (■) Rb-Aufnahme in Meerschweinchenvorhofpräparate nach 4 Stunden Unterkühlung (T 6° C) und 15 Min. Wiedererwärmen (T 34° C) als Funktion von Rb_o. Die Funktion der Sättigungskurve ist in der Abb. angegeben; Regressionskoeffizient der Gerade (■): r = 0.994. Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ($s_{\bar{x}}$ teilweise innerhalb der Symbole), Anzahl der Experimente n 3 bis 23

Ordinate: Rb-Aufnahme (V_{Rb}) in mMol/lF.W. Min.
Abszisse: Rb-Konzentration der Badlösung in mM

4.1.4 Aktive K-Aufnahme als Funktion der extrazellulären K-Konzentration nach Konditionierung der Präparate

In der Versuchsreihe wurde die Ouabain (10^{-4} M) hemmbare K-Aufnahme in Präparate des Meerschweinchenvorhofs als Funktion der extrazellulären K-Konzentration ermittelt. Der Versuchsablauf geht aus dem Schema der Abb. 3 hervor, die Meßergebnisse sind in Tab. 4 zusammengestellt. Durch die Unterkühlung in K-armer Tyrodelösung ($T = 6^{o}$ C, K_o = 1.35 mM) wurden die Präparate mit Na_i beladen und an K_i verarmt. Bei den Ouabain vergifteten Präparaten war nach dem Wiedererwärmen eine ähnliche K_i wie direkt nach der Unterkühlungsperiode vorhanden (vgl. Spalte a und c), daraus folgt die Hemmung der aktiven K-Aufnahme durch die Ouabainkonzentration von 10^{-4} M.

Die Ermittlung kleiner Änderungen intrazellulärer K-Konzentrationen ist mit der angewandten Flammenphotometrie schwierig, da die Bestimmung auf einer Messung der relativ hohen Gesamtkonzentration der Präparate beruht und dabei ein kleiner Flux nicht erfaßt werden kann.

Aufgrund der Meßwerte der Tab. 4 konnten somit passive Änderungen der K_i im untersuchten Konzentrationsbereich als Funktion von K_o nicht eindeutig ermittelt werden. Beim Wiedererwärmen in Tyrodelösungen mit unterschiedlichen K_o nahm K_i als Funktion von K_o zu (Tab. 4 Spalte b), und die Na_i nahm ab. Bei den Ouabain (10^{-4} M)-behandelten Präparaten ergaben die Meßwerte beim Wiedererwärmen eine Verringerung der Na_i, daher muß auf einen passiven Na-Efflux geschlossen werden (Tab. 4, Sp. c, s. auch Tab. 3).

Tab. 4: Intrazelluläre Na- und K-Konzentrationen von Meerschweinchenvorhöfen nach Unterkühlung und nach Wiedererwärmen als Funktion von K_o

	Na_i (mMol/lF.W.)			K_i (mMol/lF.W.)		
(mM)	a)	b)	c)	a)	b)	c)
K_o	6°C	34°C	34°C+Ouab.	6°C	34°C	34°C+Ouab.
0.67	43.4 n=1	40.7±1.8 n=3	47.6±3.6 n=3	90.5 n=1	89.2±4.3 n=3	78.0±1.7 n=3
1.35	76.9±1.8 n=6	55.1±4.0 n=6	60.6±4.3 n=5	67.1±3.7 n=6	83.5±2.8 n=6	67.0±1.8 n=5
2.7	77.6 n=1	41.2±1.9 n=2	53.6±4.4 n=3	66.8 n=1	102.0±3.4 n=2	81.9±4.2 n=3
5.4	67.6±2.1 n=10	38.4±2.6 n=8	53.3±3.2 n=10	74.2±2.4 n=10	99.8±4.0 n=8	74.8±2.4 n=10

4.1.5 Kinetische Analyse der Ouabain hemmbaren K- bzw. Rb-Aufnahme

Aufgrund der Meßdaten zur aktiven K- und Rb-Aufnahme wurde analog einer Enzymkinetik eine Analyse der aktiven Kationenaufnahme in Herzmuskelzellen des Meerschweinchenvorhofes durchgeführt.

Da Rb bei der flammenphotometrischen Untersuchung des Transportmechanismus den Vorteil bietet, auch die Größe des passiven Rb-Influx bestimmen zu können, steht die kinetische Analyse des Ouabain hemmbaren Rb-Transports im Vordergrund der folgenden Darstellung. Die kinetischen Daten der aktiven K-Aufnahme in die Präparate werden anschließend im Vergleich angeführt.

Wie in Kap. 2.1.1 dargelegt, kann der aktive Na-K-(Rb)-Transport als enzymatische Reaktion aufgefaßt werden (vgl. Abb. 1). Für die Berechtigung dieser Annahme sprechen die Befunde der Sättigungskinetik (s. Abb. 6 und Gl. 2.1.13) und die Hemmung des Kationentransportes durch Ouabain (s. Tab. 3 und 4).

Analog einer enzymkatalysierten Reaktion kann die aktive K- bzw. Rb-Aufnahme durch einen Carrier in Meerschweinchenvorhofpräparate mit kinetischen Gleichungen beschrieben werden. Bei dem carriervermittelten Rb-Einwärtstransport wird die Annahme gemacht, daß das Carriermolekül eine reversible Bindung mit einem oder mehreren Rb-Ionen zu einem Carrier-Rb-Komplex eingeht (C-Rb) und Rb auf diese Weise an den Carrier gebunden durch die Membran in die Zelle transportiert wird.

Die Anwendung der Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen auf die aktive Rb-Aufnahme ergibt die Gleichung:

$$K_m = \frac{[Rb]_o \cdot ([C]-[CRb])}{[CRb]} \qquad 2.1.1.4$$

[C] = Gesamtkonzentration an Carriermolekülen
[CRb] = Konzentration an besetzten Carriermolekülen

Der K_m-Wert stellt ein Maß für die Affinität zwischen Carriermolekül und transportiertem Kation dar, wobei ein kleiner K_m-Wert eine hohe Affinität bezeichnet.

Bei hohen Substratkonzentrationen Rb_o arbeitet das Transportsystem im Sättigungsbereich mit der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max}. Die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt den mathematischen Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion und der Substratkonzentration. Angewandt auf die aktive Rb-Aufnahme folgt (s. Kap. 2.1.1):

$$A_{Rb} = \frac{A_{max}\ [Rb]_o}{K_m + [Rb]_o} \qquad 2.1.1.5$$

Die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, entspricht dem K_m-Wert. Die Ableitung der kinetischen Gleichungen ist in Kap. 2.1.1 dargestellt.

Die Meßwerte der Tab. 4 sind in Abb. 6 gezeigt. Bei niedrigen Rb_o (< 1.35 mM) ist die Geschwindigkeit der aktiven Rb-Aufnahme proportional der Rb_o, bei hoher Rb_o arbeitet das Transportsystem im Sättigungsbereich, d. h. alle Carriermoleküle sind mit Rb besetzt. Die maximale Geschwindigkeit der Rb-Aufnahme hat den Wert 2.8 mMol/lF.W. Min. Die Geschwindigkeit ist halbmaximal bei Rb_o = 3.2 mM. Die Funktionsgleichung ist

in der Abb. 6 angegeben. Für den Rb-Einwärtstransport wird unter diesen Bedingungen ein aktiver Transportmechanismus angenommen.

Die Abb. 7 zeigt die kinetische Analyse der aktiven Rb- und K-Aufnahme in die Vorhofpräparate in einer doppeltreziproken Auftragung nach LINEWEAVER & BURK als Funktion der Substratkonzentration im Organbad. Hinsichtlich der Bestimmung der Größe der aktiven K-Aufnahme gilt die Einschränkung, daß aufgrund der fehlenden Meßdaten zum passiven K-Influx eine Überschätzung der aktiven K-Aufnahme möglich ist.

Auf der Ordinate ist der Kehrwert der Geschwindigkeit der aktiven Kationenaufnahme $(mMol/lF.W.\ Min.)^{-1}$ aufgetragen, die Abszisse zeigt die reziproke K- bzw. Rb-Konzentration im Organbad (mM^{-1}). In dieser Darstellung ist die Geschwindigkeit der aktiven Rb-Aufnahme eine lineare Funktion der Rb_o, die Meßpunkte korrelieren mit einem Regressionskoeffizienten von r = 0.983. Die Gerade schneidet die Abszisse bei 1/-0.31, daraus folgt ein $K_{m(Rb)}$-Wert von 3.2 mM. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate gibt die maximale Rb-Aufnahmegeschwindigkeit mit 2.84 mMol/lF.W. Min. an. Die ermittelten kinetischen Daten der aktiven Rb-Aufnahme sind in Gl. 2.1.15 eingesetzt, und die Funktionsgleichung ist in Abb. 6 dargestellt.

Ohne Berücksichtigung der mit dieser Methode nicht zu bestimmenden passiven K-Fluxe, jedoch unter gleichen experimentellen Bedingungen, wurde der Wert der halbmaximalen aktiven K-Aufnahme $K_{m(K)}$ zu 1.1 mM und die maximale Geschwindigkeit zu v_{max} = 1.95 mMol/lF.W. Min. bestimmt (r = 0.997).

Der Vergleich von aktiver Rb- und K-Aufnahme zeigt, daß es gerechtfertigt ist, wie an Purkinjefasern (EISNER & LEDERER 1980b) auch an Meerschweinchenvorhofpräparaten Rb als K-Ersatz zur Charakterisierung des aktiven Ionentransportmecha-

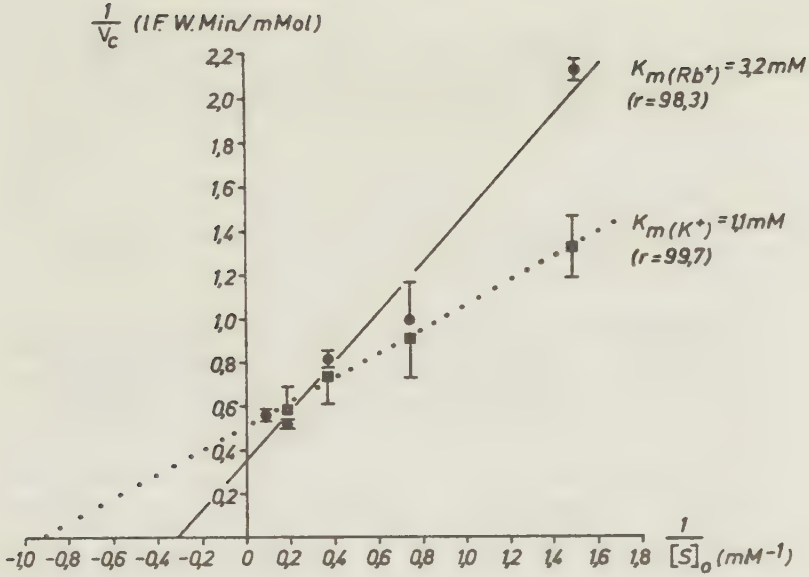


Abb. 7: Doppelt-reziproke Auftragung der Ouabain (10^{-4} M) hemmbaren Rb- (durchgezogene Linie) und K-Aufnahme (punktierte Linie) als Funktion der jeweiligen Konzentration im Organbad.

Die Werte der halbmaximalen Rb- bzw. K-Aufnahme sowie die Regressionskoeffizienten sind in der Abb. angegeben, Mittelwerte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Ordinate: reziproke Kationenaufnahme $\frac{1}{v_c}$ in l Faserwasser. Minute pro mMol

Abszisse: reziproke K- bzw. Rb-Konzentration im Organbad in mM^{-1}

nismus experimentell zu verwenden. Die Verwendung von Rb bietet den Vorteil, quantitative Aussagen über die aktive und passive Komponente der Kationenaufnahme machen zu können.

4.2 Versuchsserie I B: Die aktive Rb-Aufnahme in Vorhofpräparate als Funktion der Na_i

Die Abhängigkeit der Rb-Aufnahme von der Na_i wurde in der Versuchsserie I B untersucht. Durch Unterkühlung in Na-freier, 150 mM TRIS haltiger Lösung wurden die Präparate an Na_i und K_i verarmt (Schema des Versuchsablaufs s. Abb.4).

Die Berechnung der Na_i ist in der Beschreibung der Methoden (s. Ziff. 3.2.5) dargelegt, die Na_i-Konzentrationen und die aktive Rb-Aufnahme sind in Tab. 5 angegeben.

Tab. 5: (Versuchsserie I B)
Ouabain (10^{-4} M) hemmbare Rb-Aufnahme als Funktion von Na_i bei Rb_o = 1.35 mM und T 34° C

Na_i mMol/lF.W.	aktive Rb-Aufnahme mMol/lF.W. Min.
8.4 ± 1.3 n = 6	0.15 ± 0.02
11.0 ± 2.3 n = 6	0.42 ± 0.01
16.0 ± 1.6 n = 6	0.75 ± 0.01
21.1 ± 2.0 n = 9	0.91 ± 0.01
50.5 ± 0.6 n = 3	0.99 ± 0.01

Bei Präparaten, die in Na-freier Lösung unterkühlt und in Na-freier Lösung mit 1.35 mM Rb_o wiedererwärmt wurden (Na_i = 7.7 ± 0.1 mMol/lF.W., n = 3), konnte keine Ouabain hemmbare

Rb-Aufnahme in die Vorhofpräparate gemessen werden. Die nicht durch Ouabain hemmbare Rb-Aufnahme betrug unter diesen Bedingungen 0.16 $\pm$ 0.02 mMol/lF.W. Min. (n = 3). In Abb. 8 ist die Ouabain hemmbare Rb-Aufnahme als Funktion der intrazellulären Na-Konzentration dargestellt (Rb_o = 1.35 mM). Die linke Ordinate gibt die Rb-Aufnahme in mMol/lF.W. Min. an, die rechte Ordinate die Rb-Aufnahme in pMol/cm^2 Membranoberfläche . s, berechnet unter der Annahme, daß 1 g Feuchtgewicht = 1000 cm^2 Membranoberfläche entspricht (WINEGRAD & SHANES 1962).
Auf der Abszisse ist die intrazelluläre Na-Konzentration in mMol/lF.W. als Mittelwert zum Zeitpunkt 7.5 Minuten nach Beginn des Wiedererwärmens aufgetragen. Die graphische Darstellung der Meßdaten zeigt eine sehr steile Abhängigkeit der aktiven Rb-Aufnahme von der Na_i zwischen 10 und 20 mMol/lF.W. Bei Na_i = 11 mMol/lF.W. betrug die Ouabain hemmbare Rb-Aufnahmegeschwindigkeit 0.42 $\pm$ 0.01 mMol/lF.W. Min. (n = 6), bei etwa verdoppelter Na_i nahm die Rb-Aufnahme um den Faktor 2.2 zu, d. h. im Konzentrationsbereich 10 bis 20 mMol/lF.W. Na_i ist die Abhängigkeit der Rb-Aufnahme von Na_i etwa linear. Bei Na_i-Konzentrationen $>$ 20 mMol/l F.W. flacht der Kurvenzug ab, es liegt eine Sättigung bei höheren Na_i Konzentrationen vor.

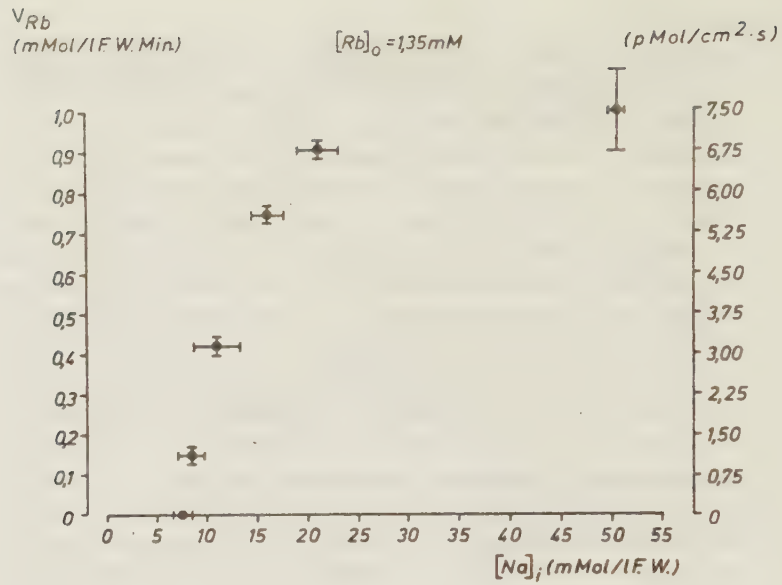


Abb. 8: Geschwindigkeit der Ouabain (10^{-4} M) hemmbaren Rb-Aufnahme als Funktion der intrazellulären Na-Konzentration bei Rb_o = 1.35 mM und T = 34° C

Mittelwerte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (Versuchsserie I B)

linke Ordinate: Rb-Aufnahmegeschwindigkeit (v_{Rb}) in mMol/lF.W. Min.

rechte Ordinate: Rb-Aufnahme in pMol/cm^2 Membranoberfläche · s, berechnet aufgrund der Annahme: 1 g Feuchtgewicht = 1000 cm^2 (WINEGRAD & SHANES 1962)

Abszisse: intrazelluläre Na-Konzentration in mMol/lF.W.

4.2.1 Abschätzung der Na_i-Bindungsstellen am Na-K-Transportsystem aufgrund des Ouabain-hemmbaren Rb-Einwärtstransports (HILL-Diagramm)

Dem Modell des Na-Auswärtstransportes durch einen membrangebundenen Carrier liegt die Annahme von 3 Na-Bindungsstellen zugrunde (s. Abb. 1). Dabei können an einem Carriermolekül mit mehreren Bindungsstellen diese Bindungsstellen entweder unabhängig voneinander besetzt werden, oder aber die Bindungsstellen weisen eine Interaktion auf. Wird die Besetzung der zweiten und weiterer Bindungsstellen durch die Besetzung der ersten erleichtert, spricht man von positiver Kooperativität (s. SEGEL 1976). Erhält man bei der kinetischen Analyse der Meßdaten in einer doppelt reziproken Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration einen von einer Geraden abweichenden Kurvenverlauf, so stellt dies einen Hinweis auf ein kooperatives Verhalten der Carrierbindungsstellen dar (s. KOTYK 1977).

Die Ouabain hemmbare Rb-Aufnahme ist eine Funktion von Na_i (s. Abb. 8),und gleichzeitig mit der Rb-Aufnahme erfolgt ein aktiver Na-Efflux (s. Tab. 3). Die herzglykosidhemmbare Rb-Aufnahme stellt somit bei konstanter Rb_o und konstantem Verhältnis von Na/Rb-Fluß ein quantitatives Maß des aktiven Na-Efflux dar.

Die Meßdaten der Abb. 8 sind in Abb. 9 doppelt reziprok dargestellt. Auf der Ordinate ist die Ouabain (10^{-4} M) hemmbare Rb-Aufnahme in $(mMol/lF.W.\ Min.)^{-1}$, auf der Abszisse ist die intrazelluläre Na-Konzentration in $(mMol/lF.W.)^{-1}$ aufgetragen. Der Kurvenzug weicht deutlich von einer Geraden ab und macht damit die sigmoide Abhängigkeit der Rb-Aufnahme von Na_i deutlich. Die Steilheit einer sigmoiden Kurve nimmt mit der Anzahl der besetzten Bindungsstellen des Carriermoleküls zu.

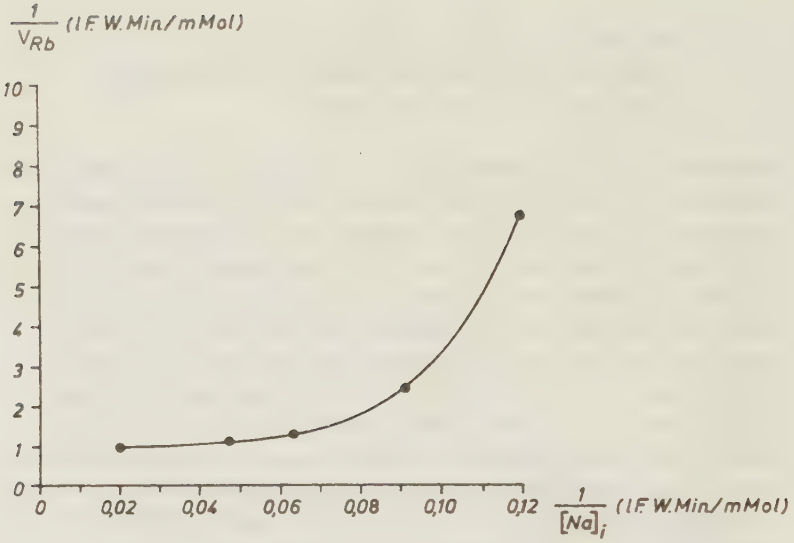


Abb. 9: Doppelt-reziproke Auftragung der Ouabain (10^{-4} M) hemmbaren Rb-Aufnahme gegen Na_i von zuvor 4 Stunden unterkühlten Meerschweinchenvorhofpräparaten (Versuchsserie I B). Der Abb. liegen die Meßwerte der Abb. 8 zugrunde.

Ordinate: reziproke Ouabain hemmbare Rb-Aufnahme in 1 F.W. Min pro mMol

Abszisse: reziproke intrazelluläre Na-Konzentration in 1 F.W. pro mMol

Die Verbindung der Meßpunkte erfolgte nach Augenmaß.

Der Kurvenverlauf weist daher auf eine Wechselwirkung von mehr als einem Na-Ion mit dem Carriermolekül hin. Der Schnittpunkt des linearen Teils der Kurve (r = 0.923) mit der Ordinate liegt bei 0,83 $(mMol/lF.W. Min.)^{-1}$ entsprechend V_{max} = 1.2 mMol/lF.W. Min, und die halbmaximale Rb-Aufnahme wird bei Na_i = 8.7 mMol/lF.W. erreicht.

Ein Maß für die Anzahl der Na-Bindungsstellen am Carriermolekül kann aus der aktiven Rb-Aufnahme als Funktion der Na_i-Konzentration durch eine Darstellung in einem HILL-Diagramm erhalten werden.

Der Transport eines Kations durch eine biologische Membran wird dabei formal analog einer enzymkatalysierten Reaktion aufgefaßt (s. Ziff. 2.1.1). Am Carriermolekül werden n äquivalente Kationenbindungsstellen angenommen, und bei ausgeprägter Kooperativität der Kationenbindung ist die Konzentration des Carrier-Substrat-Komplexes mit weniger als n Substratmolekülen bei jeder Substratkonzentration S vernachlässigbar klein. Bestimmend ist für die Reaktionsgeschwindigkeit unter dieser Voraussetzung nach Ziff. 2.1.4 $[S]^n$ (s. SEGEL 1976). Den mathematischen Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration beschreibt die HILL-Gleichung (Gl. 2.1.4.1). Zur graphischen Ermittlung der Anzahl der Bindungsstellen dient ihre lineare Form (Gl. 2.1.4.7).

Trägt man $\ln(v/v_{max}-v)$ gegen $\ln Na_i$ auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung n. Gilt bei der Reaktionsfolge die Voraussetzung starker Kooperativität nicht, so ergibt die Steigung der Geraden den HILL-Koeffizienten h. Der HILL-Koeffizient entspricht dann nicht der Zahl der Substratbindungsstellen, sondern stellt ein qualitatives Maß für die Art der Wechselwirkung von Substrat und Bindungsstellen dar (vgl. Ziff. 2.1.4 und s. SEGEL 1976).

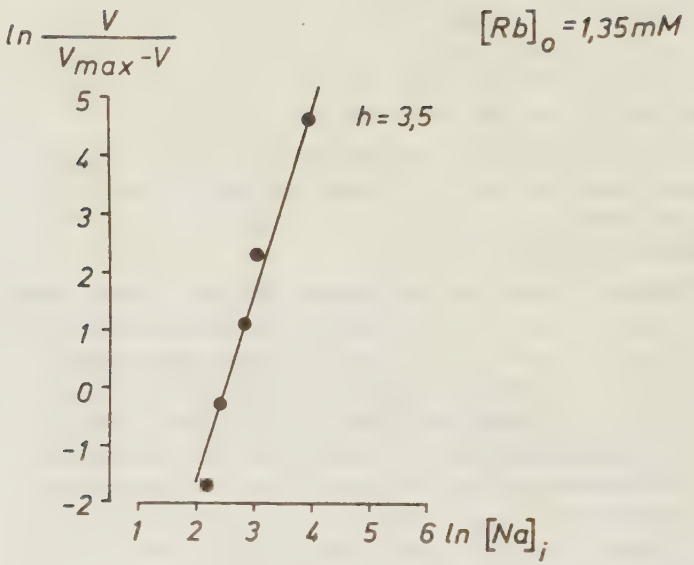


Abb. 10: Hill-Diagramm der aktiven Rb-Aufnahme als Funktion von Na_i bei Rb_o =1.35 mM. Auf der Ordinate ist der Logarithmus von $v/(v_{max}-v)$ aufgetragen; v bedeutet die aktuelle und v_{max} die maximale Ouabain hemmbare Rb-Aufnahme. Auf der Abszisse ist der Logarithmus der mittleren intrazellulären Na-Konzentration (mM) der Präparate angegeben. Die Auftragung der Werte ergibt näherungsweise eine Gerade (r = 0.987), der Anstieg der Geraden ergibt den Hill-Koeffizienten h = 3.5. Aus dem Hill-Koeffizienten >1 folgt, daß mehrere Bindungsstellen für Na_i am Carriermolekül vorhanden sind.

4.2.2 Abschätzung der K_o $(Rb)_o$-Bindungsstellen am Na-K (Rb)-Transportsystem aufgrund des Ouabain-hemmbaren K (Rb)-Einwärtstransports

Auf der Grundlage der Meßwerte der Tab. 3 und 4 kann aus der aktiven K (Rb)-Aufnahme in die Meerschweinchenvorhof-präparate eine Hill-Analyse zur Abschätzung der extrazellulären K (Rb)-Bindungsstellen am Carriermolekül erfolgen.

Aus der maximalen aktiven Rb-Aufnahme (s. Abb. 7) und den Meßwerten der aktiven Rb-Aufnahme als Funktion der Rb_o wurde nach Gl. 2.1.4.7 das Hill-Diagramm erstellt. In der gleichen Weise läßt sich eine Abschätzung der K_o-Bindungsstellen am Carriermolekül aus den Meßwerten der Ouabain hemmbaren K-Aufnahme erhalten. Die Abb. 11 zeigt die Hill-Diagramme zur Ermittlung der Zahl der Rb (●) bzw.K(■)-Bindungsstellen am Carriermolekül.

In den Teilabbildungen 11 A und B ist jeweils der Logarithmus aus der Rb (K)-Aufnahmegeschwindigkeit zur Differenz aus maximaler und aktueller aktiver Rb (K)-Aufnahme in mMol/lF.W. Min. auf der Ordinate und auf der Abszisse der Logarithmus der Rb_o (K_o) der Badlösung aufgetragen Die mittlere Na_i betrug bei der aktiven Rb-Aufnahme ~51.4 mMol/lF.W., bei der aktiven K-Aufnahme ~55.2 mMol/lF.W. Diese sehr ähnlichen Na_i-Konzentrationen zeigen, daß Rb und K-Aufnahme unter vergleichbaren Versuchsbedingungen untersucht wurden.

Das in der Teil-Abb. 11 A dargestellte Hill-Diagramm zur Ermittlung der Rb-Bindungsstellen ergibt einen Hill-Koeffizienten von h = 1.1. Die Teil-Abb. 11 B zeigt das Hill-Diagramm der aktiven K-Aufnahme in Vorhofpräparate als Funktion der K_o, und es folgt aus der Analyse ebenfalls ein Hill-Koeffizient von 1.1.

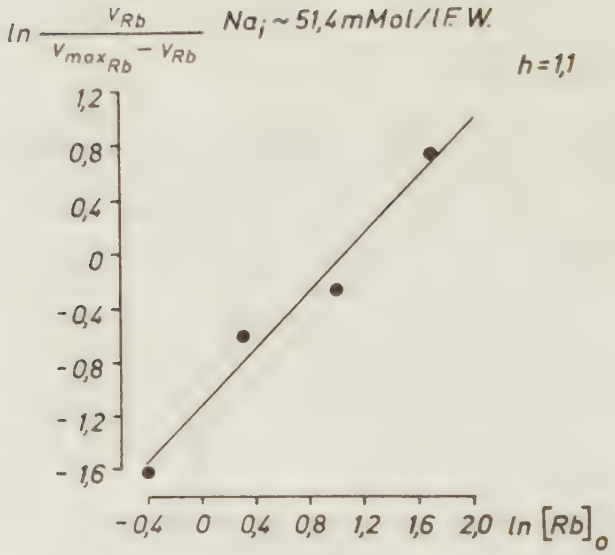


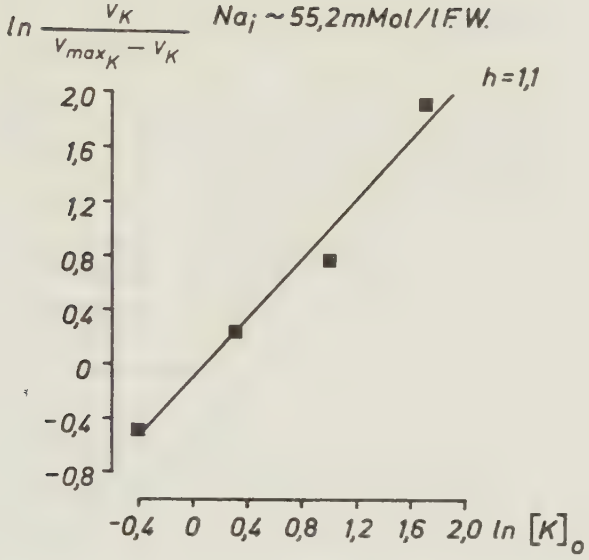
Abb. 11: Hill-Diagramme zur Bestimmung der Zahl der Rb- bzw. K-Bindungsstellen am Carriermolekül

Teil-Abb. A: Bestimmung der Zahl der Rb-Bindungsstellen

Ordinate: Logarithmus von $v/(v_{max} - v)$; v bedeutet die aktuelle und v_{max} die maximale Ouabain hemmbare Rb-Aufnahme

Abszisse: Logarithmus Rb_o; Rb_o in mM

Die mittlere Na_i der Präparate betrug 51.4 mMol/lF.W., die Auftragung der Meßwerte ergibt näherungsweise (r = o.983) eine Gerade. Hill-Koeffizient h = 1.1



Teil-Abb. B: Bestimmung der Zahl der K-Bindungsstellen

Ordinate: Logarithmus von $v/(v_{max}-v)$; v bedeutet die aktuelle und v_{max} die maximale Ouabain hemmbare K-Aufnahme

Abszisse: Logarithmus K_o; K_o in mM

Die mittlere Na_i der Präparate betrug 55.2 mMol/lF.W., die Auftragung der Meßwerte ergibt näherungsweise (r =0.988) eine Gerade. Hill-Koeffizient h = 1.1
Die Ableitung des Hill-Diagramms ist unter Ziff. 2.1.4 erläutert.

Eine Verschiebung des Ordinatenmaßstabes des Hill-Diagramms der Geschwindigkeit der aktiven K-Aufnahme zu höheren Werten resultiert aus der leicht höheren aktiven K-Aufnahme im Vergleich zur aktiven Rb-Aufnahme im Konzentrationsbereich von 0.67 - 5.4 mM. Die höheren K-Werte ergeben sich möglicherweise aus der Problematik der Bestimmung der passiven K-Fluxe.

Die Hill-Analyse der Rb-Bindungsstellen wurde ohne den Meßwert Rb_o = 10.8 mM durchgeführt, da die Ouabain hemmbare Rb-Aufnahme bei dieser Rb_o unter dem Wert bei 5.4 mM liegt. (vgl. Tab. 3). Die Verringerung der aktiven Rb-Aufnahme bei höheren Rb_o steht in Übereinstimmung mit den Messungen von GLITSCH & PUSCH (in: GLITSCH 1979), eine Erklärung dieses Befundes steht noch aus.

Aus den identischen Hill-Koeffizienten der Rb- und K-Aufnahme wird die Annahme der gleichen Anzahl der Bindungsstellen am Carriermolekül nahegelegt. Aus den Hill-Koeffizienten folgt, daß zwei Bindungsstellen für Rb (K) pro Carriermolekül mit Kooperativität angenommen werden können (s. Ziff. 2.1.4, vgl. SEGEL 1976).

4.3 Versuchsserie II: Kontinuierliche intrazelluläre Messung der K-aktivierten Membranpotentialänderung an Vorhofzellen

In der Versuchsserie II wurde die zeitliche Änderung des Membranpotentials an dünnen Trabekeln aus dem linken Vorhof des Meerschweinchenherzens nach unterschiedlichen Konditionierungszeiten in K-freien Badlösungen gemessen. Um zunächst das Verhalten von Arbeitsmyokardzellen ohne experimentelle Konditionierungen zu charakterisieren, wurde das Membranpotential als Funktion von K_o im Fließgleichgewicht bestimmt. Abb. 12 zeigt die Membranpotentialwerte von ganzen linken Meerschweinchenvorhöfen (▲) und von feinen Trabekelpräparaten an zwei Zellen (● , ■) als Funktion der K-Konzentration der Badlösung bei T 34° C. Nach einer Äquilibrierungszeit von 30 Min. in Tyrodelösungen mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen wurden die Ruhemembranpotentiale gemessen. Auf der Ordinate ist das Membranpotential in 10^{-3} V, auf der Abszisse ist logarithmisch die K-Konzentration in mM aufgetragen. Die Gerade gibt die theoretisch nach der NERNSTschen Gleichung zu erwartende Änderung des Kaliumgleichgewichtspotentials bei Änderung der extrazellulären K-Konzentration an. Die Potentiale vom ganzen Vorhofpräparat wurden durch mehrere Einstiche als Mittelwert bestimmt, bei Trabekelpräparaten wurde der Lösungswechsel während eines Einstiches an einer Zelle durchgeführt und das Membranpotential nach Erreichen des neuen Gleichgewichtswertes angegeben. Dargestellt sind die Meßwerte je einer Zelle von zwei Präparaten (● , ■). Abb. 12 zeigt, daß das Ruhepotential von Vorhöfen und Trabekelpräparaten bei niedriger K_o vom K-Gleichgewichtspotential abweicht.

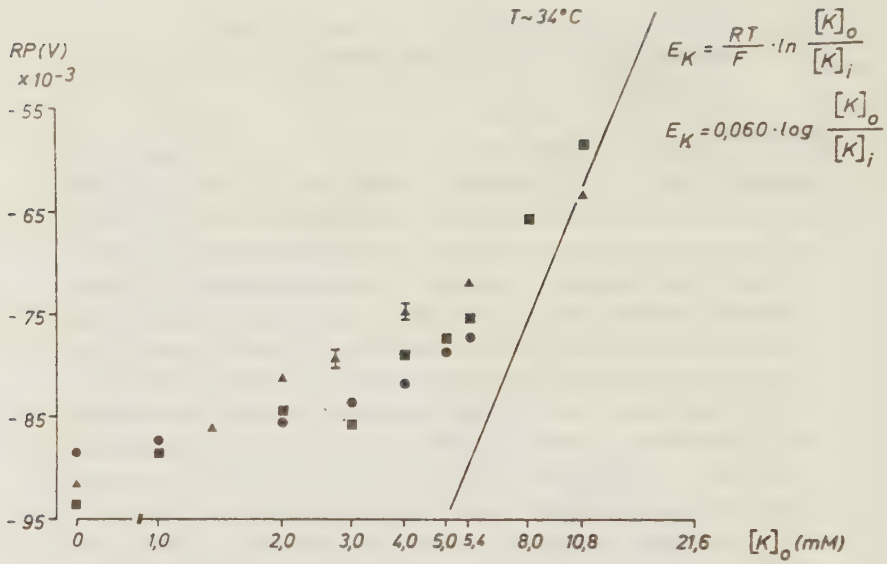


Abb. 12: Membranpotentiale linker Meerschweinchenvorhofpräparate (▲) und Trabekelpräparate (● , ■) als Funktion der extrazellulären K-Konzentration.

Die Meßpunkte (● , ■) geben die Potentiale als Funktion der K_o bei kontinuierlicher Registrierung in einer Herzmuskelzelle wieder. Die Symbole (▲) geben die als Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ bestimmten Membranpotentiale wieder; teilweise liegt der mittlere Fehler des Mittelwertes innerhalb der Symbole. In der Abb. ist die Berechnung des E_K in V nach der NERNSTschen Gleichung sowie die Veränderung von E_K als Funktion von K_o dargestellt.

Ordinate: Membranpotential in 10^{-3} V

Abszisse: logarithmisch unterteilt K_o in mM

Die Membranpotentiale, die als Mittelwerte (▲) bestimmt wurden, sind über einen Konzentrationsbereich von 1.35 bis 10.8 mM K_o etwas positiver als die Potentialwerte bei kontinuierlicher Registrierung. Die Bestimmungen der Membranpotentiale nach beiden Methoden zeigen aber insgesamt für die Bedingungen des Fließgleichgewichts eine gute Übereinstimmung.

4.3.1 Messung der K-aktivierten Membranpotentialänderung

Wie aus Abb. 12 hervorgeht, nimmt das Ruhemembranpotential einer Herzmuskelzelle im steady state bei Erhöhung von K_o ab. Werden die Zellen jedoch durch längere Konditionierung in K-freier Lösung aus dem Fließgleichgewicht gebracht, tritt bei K-Zugabe zur Badlösung eine vorübergehende Hyperpolarisation des Membranpotentials auf, die als Funktion der Zeit auf den Ruhepotentialwert zurückgeht.

Abb. 13 A zeigt den Membranpotentialverlauf einer Herzmuskelzelle bei Zugabe von 5.4 mM K_o nach einer Bespülung mit K-freier Badlösung für 11 Min. Auf der Ordinate ist das Membranpotential in mV, als Abszisse der Zeitmaßstab 1 Min. angegeben.

Während der Konditionierung des Trabekelpräparates in K-freier Tyrodelösung wurde ein maximales Membranpotential von -84.6 mV gemessen. Kurz vor dem Lösungswechsel erreichte das Potential einen Wert von -82.9 mV, nach dem Umschalten auf 5.4 mM K-haltige Badlösung stieg das Potential innerhalb von 40 Sek. auf das Maximum von -91.0 mV an. Danach ging die Hyperpolarisation auf den Ausgangswert von -78.3 mV in Standardtyrodelösung zurück.

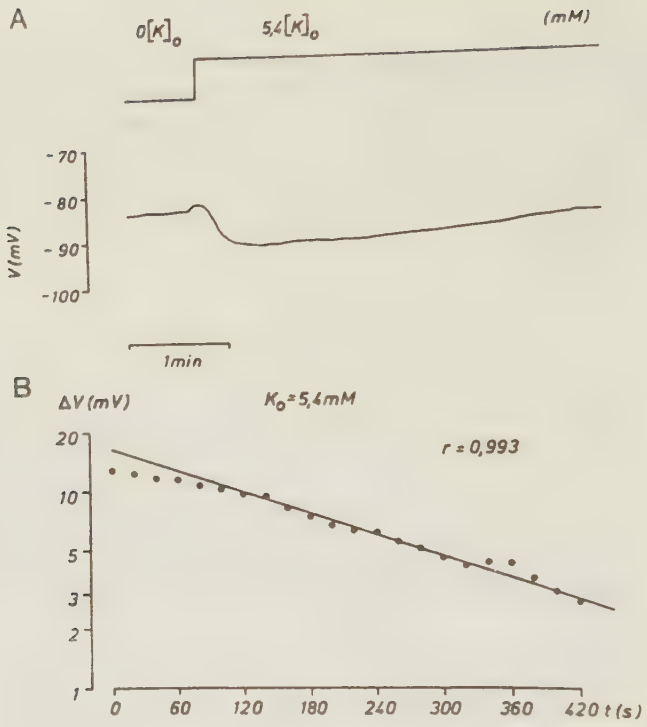


Abb. 13: K-aktivierte Zellantwort nach 11 Min. Konditionierung in K-freier Tyrodelösung; T 34° C.

Teil-Abb. A: Registrierung des Membranpotentialverlaufs beim Wechsel auf 5.4 mM K-haltige Tyrodelösung

Die Versuchsbedingungen sind am oberen Bildrand schematisch angegeben.

Ordinate: Membranpotential in mV
Abszissenmaßstab: 1 Min.

Teil-Abb. B: Hyperpolarisation ΔV während der K-aktivierten Antwort als Funktion der Zeit
Ordinate: logarithmisch unterteilt; Potentialdifferenz ΔV in mV
Abszisse: Zeit in Sek. nach Erreichen der maximalen Hyperpolarisation

Die Abb. 13 B zeigt in halblogarithmischer Darstellung die Abnahme der Hyperpolarisation als Funktion der Zeit.

Auf der Ordinate ist die Potentialdifferenz zum Ruhemembranpotential in mV, auf der Abszisse ist die Zeit in Sekunden aufgetragen. Die maximale Potentialdifferenz beträgt 12.7 mV, 80 Sekunden nach dem Maximum ist das Membranpotential um 10.9 mV negativer als das Ruhemembranpotential im steady state. Der weitere Rückgang der Hyperpolarisation ist exponentiell, in der halblogarithmischen Darstellung ergibt sich eine Gerade, die Meßwerte korrelieren miteinem Regressionskoeffizienten von r = 0.993.

4.3.2 Bestimmung der Zeitkonstante τ des Membranpotentialverlaufs nach Konditionierungszeiten in K-freier Tyrodelösung

Das Ruhemembranpotential der Herzmuskelzellen ist im steady-state eine Funktion von K_o (s. Abb. 12, vgl. Abb. 2).

Während einer kurzen Bespülungszeit mit K-freier Lösung bleibt Na_i unverändert (EISNER et al. 1981a, GLITSCH et al. 1981), und eine Aktivierung des aktiven Na-K-Transports durch Na_i ist bei diesem experimentellen Vorgehen nicht zu erwarten. Die auftretenden Membranpotentialveränderungen sind unter diesen Bedingungen nicht auf den aktiven Na-K-Transport, sondern auf veränderte passive Membraneigenschaften zurückzuführen.

Zu jeder 'langen' Konditionierungsphase der Präparate in K-freier Lösung($\geq$ 10 Min.) wurde zur Bestimmung der passiven Membranpotentialänderungen eine 'kurze' Bespülung mit K-freier Lösung ($\sim$1 Min.) durchgeführt. Abb. 14 zeigt zwei übereinander gezeichnete Originalregistrierungen des Potentialverlaufes eines Trabekelpräparates nach einer Konditionierungszeit von a) 1.1 Min. und b) 11.0 Min. in K-freier Badlösung. Der Zeitpunkt des Lösungswechsels ist am oberen Bildrand angegeben, die Ordinate gibt das Potential in mV an. Als Abszisse dient der Zeitmaßstab 1 Min. Der Potentialverlauf a) zeigt einen steilen Anstieg beim Wechsel auf K-freie Tyrodelösung von -74.2 mV auf -86.3 mV. Bei Zugabe von 5.4 mM K_o depolarisierte das Potential schnell auf den Ausgangswert.

Der Potentialverlauf b) zeigt das typische Verhalten nach einer langen Konditionierungszeit in K-freier Lösung. Am Ende der 11-minütigen Konditionierung (K_o = 0 mM) erreichte das Potential den Wert -84.6 mV, nach Zugabe von 5.4 mM K_o trat die Hyperpolarisation ΔV von 12.7 mV über das Ruhe-

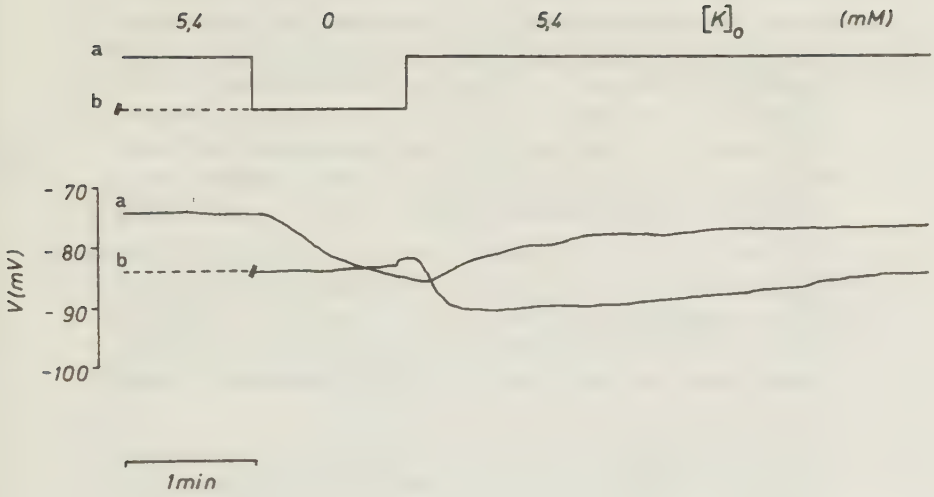


Abb. 14: Kontinuierliche Registrierung des Membranpotentials eines Trabekelpräparates. Konditionierungszeit a) 1.1 Min. und b) 11.0 Min. in K-freier Lösung, Rückkehr auf Standardtyrodelösung (T 34° C)

Das Schema des Versuchsablaufs ist am oberen Bildrand angegeben.

Ordinate: Membranpotential in mV
Abszissenmaßstab: 1 Minute

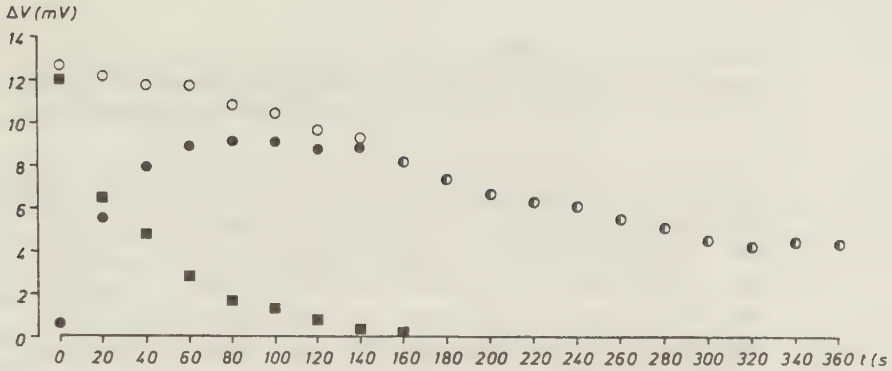
membranpotential hinaus auf, die zeitabhängig auf den im Registrierbeispiel nicht mehr angegebenen Ausgangswert -78.3 mV zurückging.

Die K-haltige Tyrodelösung kann aufgrund des Organbadvolumens und der interzellulären Spalträume des Präparates die Zellmembran nur mit einer zeitlichen Verzögerung (Totzeit) erreichen. Um diese passiven, K-diffusionsbedingten Änderungen des Potentials bei der Bestimmung der Zeitkonstante τ der K-aktivierten Zellantwort zu erfassen, wurden die Potentialdifferenzen zum steady state-Wert beider Potentialverläufe als Funktion der Zeit errechnet. Die Potentialdifferenzen zwischen dem aktuellen Membranpotential beim Wechsel auf 5.4 mM K_o und dem Ruhemembranpotential vor Bespülung mit K-freier Lösung sind in Abb. 15 A aufgetragen.

Die Ordinate zeigt die Potentialdifferenz in mV, die Abszisse gibt die Zeit in Sekunden vom maximalen Potential nach dem Lösungswechsel an. Das maximal auftretende Potential wird als Bezugswert gewählt, um für die Beschreibung der Potentialabnahme einen festen, von Diffusionsbedingungen unabhängigen Wert zu erhalten.

Der Potentialverlauf a) (■) ergab die maximale Differenz von 12.1 mV, es setzte anschließend eine sehr schnelle Depolarisation ein, nach 60 Sekunden betrug die Differenz noch 2.9 mV. Nach 160 Sekunden war das Ruhemembranpotential wieder erreicht. Die Auftragung der Potentialdifferenzen des Verlaufs b) (11.0 Min. O K_o; O) zeigt eine maximale Differenz von 12.7 mV, nach 80 Sekunden erreichte die Differenz den Wert 10.9 mV und nach 360 Sekunden betrug die Differenz zum Ruhepotential noch 4.3 mV. Der Unterschied zwischen beiden Kurvenverläufen wurde errechnet und als dritte Kurve (●) in die Abb. 15 A und B eingetragen. Diese Differenzkurve enthält den Anteil der K-aktivierten Zellantwort nach Konditionierung der Präparate.

A



B

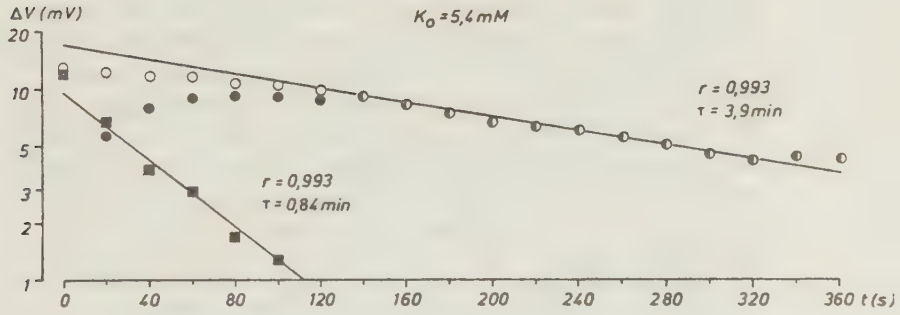


Abb. 15:

Potentialdifferenzen zum Ruhemembranpotential in A) linearer und B) halblogarithmischer Darstellung als Funktion der Zeit nach Konditionierung des Präparates für a) (■) 1.1 Min. und b) (O) 11.0 Min. in K-freier Tyrodelösung bei T 34° C. Der Kurvenverlauf (●) stellt die Differenzkurve zwischen a) und b) dar. In der Teil-Abb. B sind die ermittelten Regressionskoeffizienten sowie die Zeitkonstanten τ angegeben.

Ordinaten: Potentialdifferenzen in mV
Abszissen: Zeit nach dem maximalen Potential in Sekunden

Direkt nach dem Lösungswechsel betrug die Potentialdifferenz 0.6 mV, stieg bis zur 80. Sekunde auf den Wert 9.2 mV an und ging zum Zeitpunkt 160 Sekunden in den Verlauf der Kurve b) (◐) über.

Die Differenzwerte der Abb. 15 A sind in Abb. 15 B logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Auf der Ordinate ist logarithmisch die Potentialdifferenz in mV, auf der Abszisse ist die Zeit in Sekunden aufgetragen. In den Teil-Abbildungen 15 A und B wurden identische Symbole verwendet, die Regressionskoeffizienten der Geraden sind in der Abb. angegeben.

Nach kurzer Bespülungszeit des Präparates mit K-freier Lösung ergab die Abnahme der Membranpotentialdifferenzen in der halblogarithmischen Darstellung eine Gerade (■) mit r = 0.993, die Abhängigkeit der Potentialdifferenzen von der Zeit ist exponentiell. Die Potentialabnahme erfolgte mit der Zeitkonstanten τ = 0.84 Min. Die obere Kurve (○) gibt die Abnahme der Potentialdifferenz nach 11 Min. Konditionierung in K-freier Lösung wieder. Ab der 80. Sek. wird der Kurvenverlauf durch eine Exponentialfunktion mit der Zeitkonstanten τ = 3.9 Min. beschrieben (r = 0.993).

Die Differenzkurve (●) hat von der 140. Sek. an einen mit der Kurve b) in Abb. 15 A und B identischen Verlauf.
Aus diesem Verlauf der Differenzkurve geht hervor, daß in den Membranpotentialen nach 11 Min. Konditionierung in O K_o ein Anteil enthalten sein muß, der nicht allein mit passiven Änderungen der Membraneigenschaften erklärt werden kann.

Zu jedem Versuchsprogramm wurden die Zeitkonstanten der passiven Potentialänderungen ermittelt,und die Bestimmung der Zeitkonstante τ nach langen Konditionierungszeiten in K-freier Lösung erfolgte nach Beendigung der passiven Anteile.

4.3.3 Wirkung von Dihydro-(g-Strophanthin) auf das Membranpotential von Trabekelpräparaten

Für die Beurteilung, ob die Änderung des Membranpotentials von konditionierten Herzmuskelzellen auf den aktiven Na-K-Transport zurückzuführen ist, ist die Untersuchung der spezifischen Hemmbarkeit dieser Prozesse mit Herzglykosiden ein Kriterium.

DHO, ein gut reversibles Derivat des g-Strophanthins, wurde verwendet, um die Hemmung der K-induzierten Hyperpolarisation nachzuweisen. Abb. 16 zeigt K-aktivierte Membranpotentialänderungen nach einer Konditionierungszeit von a) (▲) 1.4 Min. in K-freier Lösung und b) (●) 10.4 Min. in K-freier Lösung mit 10^{-4} M DHO. Die Teil-Abb. c) zeigt die Abnahme der Potentialdifferenzen und die ermittelten Zeitkonstanten τ. Der Verlauf des Membranpotentials (Ordinate: mV) nach kurzer Bespülung des Trabekelpräparates (a) mit K-freier Tyrodelösung erreichte einen Potentialwert von -94.3 mV und zeigte eine rasche Depolarisation (Abszisse: Zeit in Sek.) in 5.4 mM K-haltiger Badlösung auf -78.6 mV.

Zur Untersuchung der DHO-Hemmwirkung (10^{-4} M) (Teil-Abb. b) auf den Potentialverlauf wurde 2 Min. vor dem Wechsel auf K_o = 5.4 mM DHO der K-freien Badlösung zugegeben. Der Zeitraum von 2 Min. sollte ausreichen, um das Herzglykosid an die Zellmembranen des Präparates diffundieren zu lassen. Das Membranpotential hatte zu diesem Zeitpunkt den Wert -97.2 mV. Beim Wechsel auf K-haltige Tyrodelösung mit 10^{-4} M DHO trat keine Hyperpolarisation des Membranpotentials auf, es setzte sofort eine Depolarisation ein.

In der Teil-Abb. 16c) belegen die Geraden in der halblogarithmischen Darstellung, daß die zeitliche Abnahme der Potentiale exponentiell erfolgte. Die Zeitkonstanten haben die Werte a) τ = 1.6 Min und b) τ = 1.5 Min. Die gemessenen

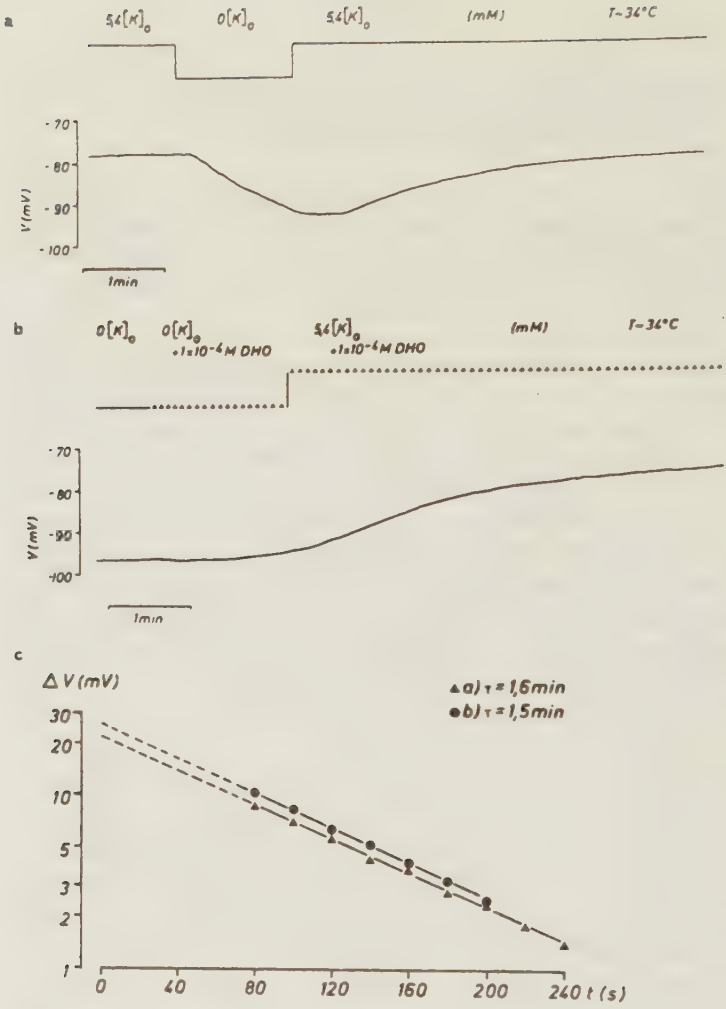


Abb. 16, Teil-Abb. a) u. b):

Membranpotentialverlauf nach 1.4 Min. (a) und nach 10.4 Min.(b) Konditionierung des Präparates in K-freier Lösung beim Wechsel auf K-haltige Badlösung ohne (a) bzw. mit (b) 1 x 10^{-4} M DHO. Das Schema des Versuchsablaufs ist jeweils am oberen Bildrand angegeben.
Ordinate: Membranpotential in mV
Abszisse: Zeitmaßstab 1 Min.
Teil-Abb. c): Bestimmung der Zeitkonstanten der Versuchsdurchläufe a) (▲) und b) (●). Die Zeitkonstanten sind in der Abb. angegeben.
Ordinate: Potentialdifferenz in mV
Abszisse: Zeit in Sekunden

Potentialverläufe und die Zeitkonstanten lassen auf eine passive Antwort der Zellmembran schließen, da auch nach langer Konditionierung des Präparates (b) nahezu dieselbe Zeitkonstante in K-haltiger DHO-haltiger Lösung ermittelt wurde. Aus dem Versuch geht hervor, daß bei diesem Präparat eine vollständige Hemmung der K-aktivierten Zellantwort durch eine DHO-Konzentration von 10^{-4} M erreicht wurde.

Das Experiment der Abb. 16 belegt, daß nach Blockierung des aktiven Transports das Membranpotential nach Konditionierung durch passive Vorgänge bestimmt wird.

An Vorhoftrabekeln wurde unter steady state Bedingungen innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe von DHO zur Badlösung eine konzentrationsabhängige Depolarisation des Membranpotentials gemessen. Abb. 17 zeigt die nach 5-minütiger Bespülung des Präparates mit DHO-haltiger Badlösung bestimmte Depolarisation als Funktion der DHO-Konzentration. Auf der Ordinate ist die Potentialdifferenz ΔD zwischen dem Membranpotential in DHO-freier und nach 5 Min. in DHO-haltiger Lösung aufgetragen. Die Abszisse gibt die DHO-Konzentration in der Badlösung in M wieder. Die Wirkung von DHO auf das Membranpotential wurde über einen Konzentrationsbereich von 10^{-6} M bis 10^{-4} M getestet. Die höchste DHO-Konzentration, die ohne irreversible Schädigung dieses Präparates verwendet werden kann, ist 10^{-4} M. Die Depolarisation betrug nach 5Min. 5.0 mV. Bei dieser Konzentration kehrte das Membranpotential beim Auswaschen mit Standardtyrodelösung innerhalb von 2 Stunden auf seinen Ausgangswert zurück.

Aus der Abb. 17 geht hervor, daß die Depolarisation des Membranpotentials im untersuchten Konzentrationsbereich eine Funktion der Herzglykosidkonzentration der Badlösung ist. Im steady state der Zelle tritt etwa die Hälfte der maximal bestimmten Depolarisation bei einer DHO-Konzentration von 5×10^{-6} M auf. Die Ergebnisse zeigen, daß auch im Fließ-

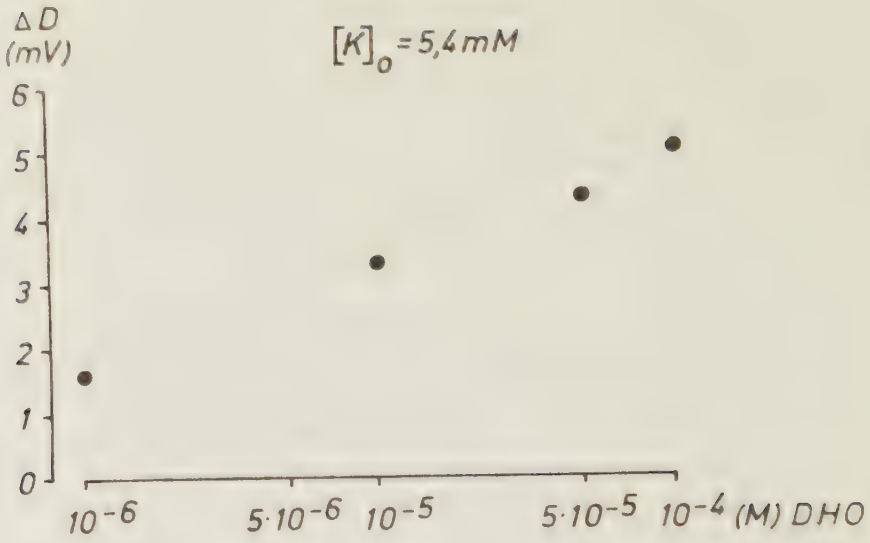


Abb. 17: Depolarisation des Membranpotentials im Fließgleichgewicht bei K_o = 5.4 mM als Funktion der DHO-Konzentration in der Tyrodelösung, bestimmt 5 Min. nach Zugabe der DHO-Konzentration

Ordinate: Potentialdifferenz ΔD zum Ruhepotential in mV

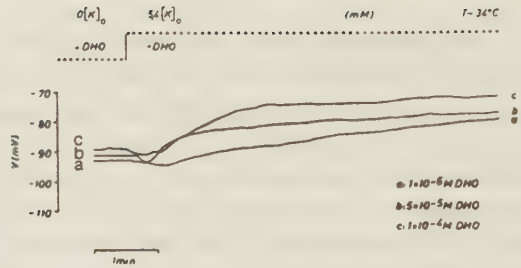
Abszisse: logarithmische Auftragung der DHO-Badkonzentration in M

gleichgewicht der Zelle die Höhe des Membranpotentials durch herzglykosidhemmbare Prozesse mitbestimmt wird.

Der Einfluß von DHO auf den Verlauf der K-induzierten Hyperpolarisation nach einer Konditionierung in K-freier Lösung wurde ebenfalls untersucht. Abb. 18 A zeigt die zeitliche Änderung des Membranpotentials in K-haltiger Tyrodelösung bei 3 unterschiedlichen DHO-Konzentrationen nach 10 Min. Konditionierung. Die Ordinate gibt das Membranpotential in mV an, die Abszisse die Zeit in Minuten. Das Schema des Versuchsablaufs ist am oberen Bildrand angegeben. Die jeweilige DHO-Konzentration wurde 2 Min. vor dem Umschalten auf 5.4 mM KCl-Tyrodelösung zur Äquilibrierung zugegeben. Bei einer DHO-Konzentration von 10^{-6} M (a) stieg das Membranpotential nach dem Wechsel auf K-haltige Lösung auf -93.6 mV an und depolarisierte anschließend auf das Ruhemembranpotential. Bei DHO-Konzentrationen von 5 x 10^{-5} M bzw. 10^{-4} M (b und c) wurde das Potential ebenfalls nach dem Umschalten auf Lösungen mit 5.4 mM KCl negativer V_{max}: b) -92.6 mV, c) -90.0 mV, jedoch verlief hier die anschließende Depolarisation wesentlich steiler als beim Durchlauf a). Die Zeitkonstanten der Depolarisationen wurden graphisch bestimmt und sind in Abb. 18 B dargestellt.

Die Ordinate gibt die Potentialdifferenz ΔV zum Ruhemembranpotential in mV wieder, auf der Abszisse ist die Zeit von V_{max} in Sekunden abgetragen. Für die Bestimmung von τ wurde von den Meßwerten ab 180 Sek. nach V_{max} der Kurvenverlauf extrapoliert, um die diffusionsbedingten Änderungen des Potentials unberücksichtigt zu lassen. Aus der Abb. ist zu ersehen, daß mit steigender DHO-Konzentration die Zeitkonstanten der Depolarisation kürzer werden, bei 10^{-4} M DHO in der Badlösung wurde eine Zeitkonstante τ = 1.3 Min. bestimmt.

A



B

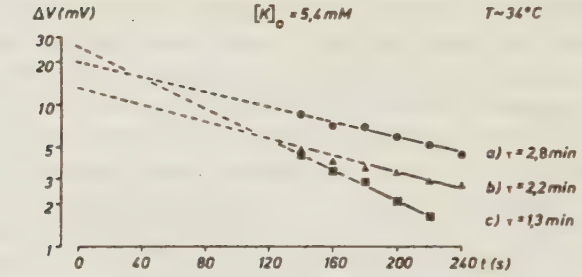


Abb. 18 A:

Membranpotentiale konditionierter Präparate in 5.4 mM K_o Tyrodelösung mit unterschiedlichen DHO-Konzentrationen. Konditionierung: 10 Min. K-frei.

Das Schema des Versuchsablaufes sowie die DHO-Konzentrationen sind in der Abb. angegeben.

Ordinate: Membranpotential in mV

Abszisse: Zeitmaßstab 1 Min.

Abb. 18 B:

Bestimmung der Zeitkonstante τ der Membranpotentialhyperpolarisation als Funktion der DHO-Konzentration.

Die entsprechenden Differenzen zum Ruhemembranpotential wurden gegen die Zeit aufgetragen, die ermittelten Zeitkonstanten sind in der Abb. angegeben.

Ordinate: logarithmische Auftragung der Potentialdifferenz ΔV in mV

Abszisse: Zeit vom Maximum der Hyperpolarisation in Sekunden

Die Zeitkonstanten der Potentialverläufe der K-aktivierten Antwort einer Zelle des Meerschweinchenvorhofpräparates nach Konditionierung (10 Min. O K_o) als Funktion der DHO-Konzentration zeigt Abb. 19. Die Zeitkonstanten sind in Minuten (Ordinate) gegen die DHO-Konzentration in M (Abszisse) der Badlösung aufgetragen. In DHO-freier Badlösung hat die Zeitkonstante einen Wert von τ = 3.1 Min., bei einer DHO-Konzentration von 10^{-5} M in der Badlösung erreicht die Zeitkonstante 80.6 %, bei 10^{-4} M 41.9 % der Zeitkonstanten unter Standardbedingungen. Bei 10^{-4} M DHO in der Badlösung stimmt die Zeitkonstante etwa mit der einer passiven Membranantwort überein. Die Zeitkonstante τ erreicht den maximalen Wert in DHO-freier Lösung (Standardtyrode), erst aus der Auftragungsweise der Abb. 19 wird diese Sättigungscharakteristik deutlich. Aus den Veränderungen der Zeitkonstanten kann auf eine DHO-konzentrationsabhängige Hemmung des aktiven Beitrags der Na-K-Pumpe zur Höhe des Membranpotentials konditionierter Herzmuskelzellen geschlossen werden.

Die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Höhe der Hyperpolarisation und der DHO-Konzentration in der Badlösung nach Konditionierung der Arbeitsmyokardzellen ist in Abb. 2o dargestellt. Da das Membranpotential in K-freier Lösung gut reproduzierbar war, wurde dieses Potential als Bezugswert zur Berechnung der Potentialdifferenz ΔH gewählt. Das andere Bezugspotential ist das nach dem Lösungswechsel auftretende maximale Potential in Badlösungen mit 5.4 mM K_o und unterschiedlichen DHO-Konzentrationen.
Eine geringe Hyperpolarisation (O.3 mV = 1o.3%) über den Potentialwert in K-freier Lösung hinaus trat bei Zugabe von 5.4 mM K_o und einer DHO-Konzentration von $1o^{-4}$M auf (89.7% Hemmung). Die Hyperpolarisation unter Kontrollbedingungen entspricht 1oo%, die Dosis-Wirkungskurve

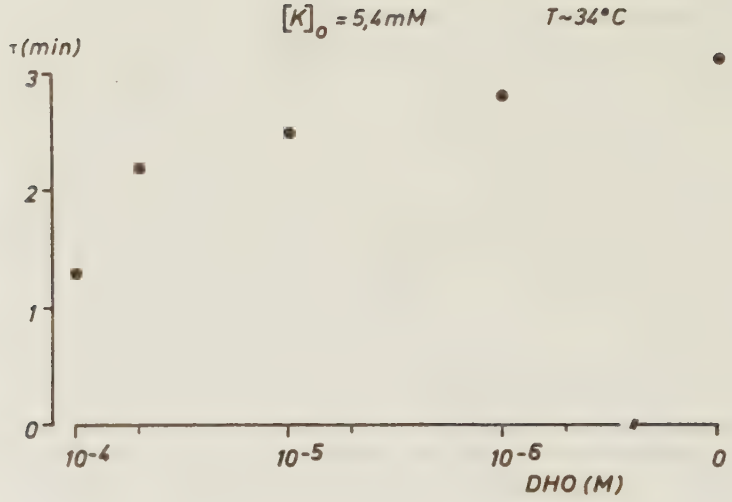


Abb. 19: Zeitkonstante der Depolarisation des Membranpotentials nach einer Konditionierungszeit von 10 Min. in K-freier Lösung als Funktion der DHO-Konzentration in 5.4 mM K_o-Badlösung

Ordinate: Zeitkonstante in Minuten

Abszisse: logarithmische Auftragung der DHO-Konzentration in der Badlösung in M

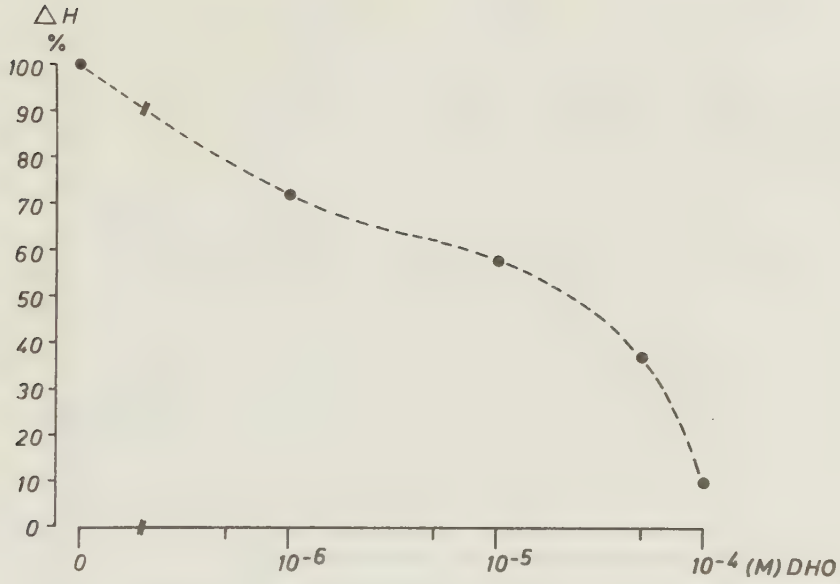


Abb. 2o: Dosis- Wirkungsbeziehung zwischen Hyperpolarisation über das Potential in K-freier Lösung hinaus (Δ H) und der DHO-Konzentration der Badlösung K_o=5.4 mM. Beim Wechsel auf 5.4 mM K-haltige Badlösung mit 1 x $1o^{-4}$M DHO-Zusatz wurde noch o.3 mV Hyperpolarisation (=1o.3%) gemessen. Die Verbindung der Punkte erfolgte durch Augenmaß.
Ordinate: Potentialdifferenz ΔH in Prozent
Abszisse: logarithmische Auftragung der DHO-Konzentration in der Badlösung in M

zeigt einen flachen Verlauf im Konzentrationsbereich von $1o^{-6}$ M bis $1o^{-5}$ M DHO. Eine logarithmische Abhängigkeit liegt im engen Bereich von 5 x $1o^{-5}$ M bis $1o^{-4}$ M vor. Aus dem Kurvenverlauf wird auf eine Hemmung von 5o% bei etwa einer DHO-Konzentration von 3 x $1o^{-5}$ M geschlossen.

4.3.4 Ist eine lokale K_o-Verarmung an der Zellmembran eine Ursache der K-aktivierten Antwort?

Auf einen direkten elektrogenen Beitrag des aktiven Na-K-Transports zur Höhe des Membranpotentials kann aus der Hemmung der Hyperpolarisation durch DHO (vgl. Abb. 16 und 18) geschlossen werden. Durch die starke Aktivierung der Na-K-Pumpe bei Zugabe von K-haltiger Badlösung kann jedoch ein Beitrag einer lokalen K-Verarmung ("depletion") zur K-aktivierten Antwort konditionierter Zellen nicht a priori ausgeschlossen werden (vgl. Einleitung Ziff. 1.3.2).

Aus dem Potentialverlauf der Abb. 21 ergeben sich Argumente, die gegen eine lokale K-Verarmung unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen sprechen. Nach der Konditionierungszeit (10 Min. O K_o) hyperpolarisierte das Potential beim Wechsel auf Tyrodelösung mit 5.4 mM K_o, dann wurde das Präparat wieder mit K-freier Lösung bespült. Die begonnene Depolarisation stoppte und das Potential blieb für 1.3 Min. auf dem Wert von -98.3 mV.

Durch erneuten Wechsel auf K-haltige Tyrodelösung erhöhte sich das Potential um 0.3 mV und depolarisierte danach mit der Zeitkonstanten τ = 4.1 Min. auf den Ruhepotentialwert von -78.6 mV. Aus Abb. 12 geht hervor, daß bei Verringerung von K_o das Membranpotential der Arbeitsmyokardzelle im steady state ansteigt und in K-freier Badlösung sein Maximum erreicht. Nach Konditionierung in K-freier Tyrodelösung tritt

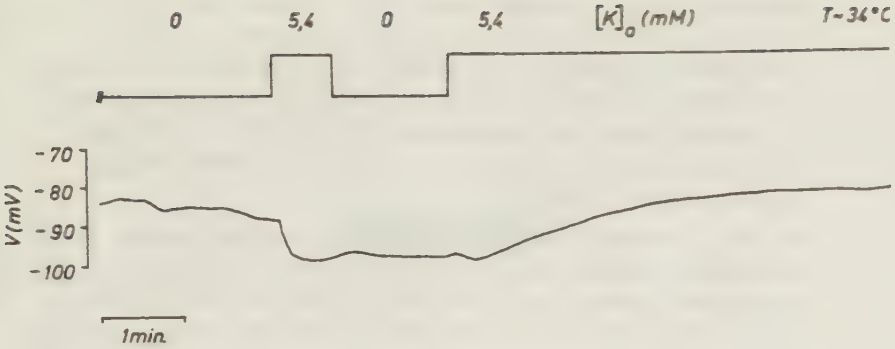


Abb. 21: K-aktivierte Antwort einer Herzmuskelzelle nach einer Konditionierungszeit von 10 Min. in K-freier Lösung beim Wechsel zwischen K-haltiger und K-freier Lösung.
Das Schema des Versuchsablaufs ist am oberen Bildrand angegeben. Die Zeitkonstante der Depolarisation hat den Wert 4.1 Min.

Ordinate: Membranpotential in mV
Abszisse: Zeitmaßstab 1 Min.

bei K-Zugabe eine Hyperpolarisation über den Potentialwert in K-freier Lösung auf (vgl. Abb. 13 A).

Da bei dem in Abb. 21 gezeigten Versuch das Potential in K-freier Lösung konstant blieb, durch Zugabe von 5.4 mM K_o jedoch eine Zunahme des Potentials erreicht wurde, ist eine lokale K-Verarmung als Grund der Hyperpolarisation unwahrscheinlich. Somit spricht die Tatsache der K-aktivierten Antwort über das Membranpotential in K-freier Lösung hinaus gegen eine "depletion" als einzige Ursache der gemessenen Hyperpolarisation.

Befunde, die eine lokale K-Verarmung an der Zellmembran ausschließen, konnten auch an Präparaten gewonnen werden, die in K-freier Tyrodelösung auf etwa -50 mV depolarisierten. Dieses Verhalten, das dem von Prukinje-Fasern ähnelt, wurde in ca. 30 % der untersuchten Trabekelpräparate aus dem Meerschweinchenvorhof gefunden.

Ein solcher experimenteller Befund, der gegen die Hyperpolarisation des Membranpotentials durch K-Verarmung spricht, ist in Abb. 22 dargestellt. Die Abb. zeigt den Verlauf des Membranpotentials in K-freier Lösung und beim Wechsel auf Standardtyrodelösung. Das Schema des Versuchsablaufs ist am oberen Bildrand angegeben. Die Ordinate zeigt das Membranpotential in mV, die Abszisse gibt den Zeitmaßstab an.

Nach einer Bespülungszeit von 5 Min. mit K-freier Badlösung depolarisierte das Potential plötzlich, das Präparat wurde für 5 Minuten spontan aktiv und wies ein Membranpotential von -56.0 mV auf. Nach dem Wechsel auf Standardtyrodelösung stieg das Potential steil an, erreichte innerhalb von 1.3 Min. das Maximum von -101.0 mV und depolarisierte mit einer Zeitkonstanten von 4.5 Min. Die horizontale Linie in der Abb. 22 gibt das maximale Membranpotential in K-freier Lösung an, es wird dadurch die Hyperpolarisation von 7.2 mV über dieses Potential verdeutlicht.

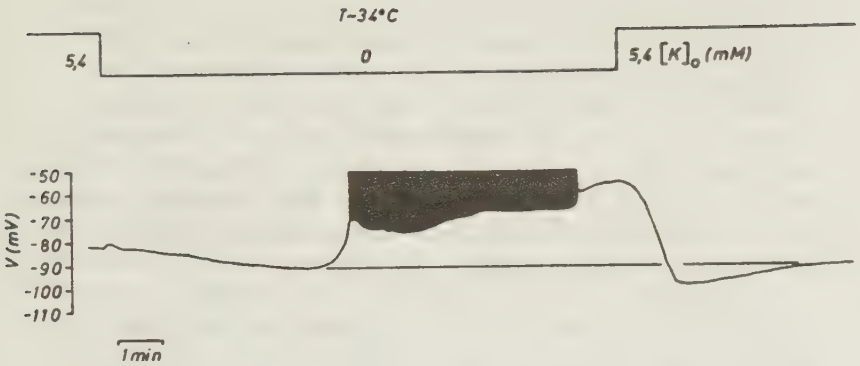


Abb. 22: Membranpotentialverlauf während der Konditionierung des Präparates in K-freier Tyrodelösung (11.7 Min.) und beim Wechsel auf Standardtyrodelösung.
Spontanaktivität des Präparates trat nach 5 Min. in K-freier Tyrodelösung auf.
Zeitkonstante der Depolarisation τ = 4.5 Min.
Das Schema des Versuchsablaufs ist am oberen Bildrand angegeben, die horizontale Linie gibt das maximale Potential in K-freier Lösung an.

Ordinate: Membranpotential in mV
Abszisse: Zeitmaßstab 1 Min.

Dieses Experiment stützt den Schluß, daß bei Trabekelpräparaten des Meerschweinchenvorhofes die K-aktivierte Hyperpolarisation nicht allein durch eine lokale Verarmung an extrazellulären K-Ionen hervorgerufen wird.

Einen Hinweis auf die Beeinflussung der Aktionspotentialdauer durch die Na-K-Pumpe nach experimenteller Konditionierung der Präparate ergibt der in Abb. 23 dargestellte Versuch. Die Teilabbildungen a) und b) zeigen die fortlaufende Registrierung des Membranpotentials einer Herzmuskelzelle unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Das Membranpotential ist auf der Ordinate, der Zeitmaßstab auf der Abszisse und der Wechsel der Badlösungen ist schematisch am oberen Bildrand angegeben. Das Membranpotential nahm in K-freier Lösung nach einer Hyperpolarisationsphase auf etwa -55 mV ab. Bei Zugabe von 5.4 mM K_o stieg das Potential steil auf etwa -90 mV an. Die anschließende kurze Bespülung mit K-freier Lösung rief eine erneute Depolarisation hervor. Auf eine Zugabe von Standardtyrodelösung reagierte das Präparat mit einer Hyperpolarisation, die anschließende Depolarisation hatte im Durchlauf a) die Zeitkonstante 3.7 Min., in b) hatte τ den Wert 3.5 Min. Im Durchlauf a) wurde ein Aktionspotential (Δ) 5.2 Min. nach dem Wechsel auf die K-haltige Lösung im Durchlauf b) nach 30 Sek. ($\blacktriangle$) ausgelöst, beide Aktionspotentiale sind in Teil-Abb. c) dargestellt. Für die Dauer des ersten Aktionspotentials (80 % Repolarisation) ergab sich ein Wert von 209 ms, für das zweite der Wert von 182 ms. Damit ist das Aktionspotential 30 Sek. nach dem Wechsel auf Standardtyrodelösung ($\blacktriangle$) um 13 % kürzer als das Aktionspotential zum Zeitpunkt 5.2 Min. nach dem Lösungswechsel(Δ).

Die Membranpotentiale beider Aktionspotentiale waren gleich groß, d. h. unter beiden Bedingungen waren Na- und K-Ströme gleich stark aktiviert. Aus der Tatsache, daß das Potential

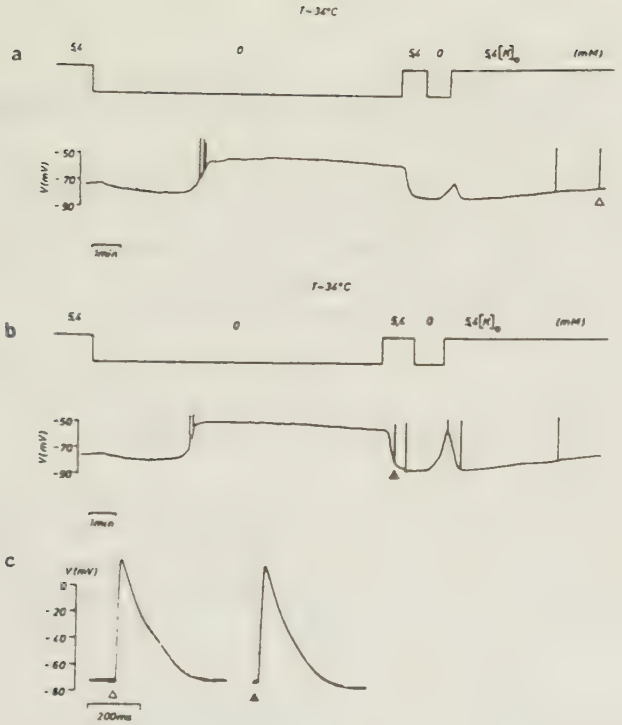


Abb. 23:

Membranpotentialverlauf und Aktionspotentialdauer zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach 11.0 Min. Konditionierung eines Trabekelpräparates in K-freier Tyrodelösung.

Das Schema des Versuchsablaufs ist am oberen Bildrand angegeben Teil-Abb. a) und b) zeigen die kontinuierliche Registrierung des Membranpotentials in einer Zelle beim Lösungswechsel; die Markierungen (△ , ▲) geben die Zeitpunkte an, zu denen ein Aktionspotential durch elektrischen Reiz ausgelöst wurde.

Teil-Abb. c) Aktionspotentiale zu den markierten Zeitpunkten. Der Vergleich der Aktionspotentialdauer nach 80 % der Repolarisation ergibt, daß das Aktionspotential ▲ um 13 % kürzer ist.

Ordinaten: Membranpotential in mV

Abszissen: Zeitmaßstab in a) und b) 1 Minute, in c) 200 ms

in Standardtyrodelösung negativer war als in K-freier Badlösung, kann gefolgert werden, daß eine lokale K-Verarmung an der Zellmembran nicht vorlag.

Ein Hinweis auf einen elektrogenen Na-Auswärtstransport kann aus der Verkürzung des Aktionspotentials (▲) während der Stimulation der Na-K-Pumpe abgeleitet werden. Der Na-Auswärtstransport erzeugt einen zusätzlichen Strom, der die Repolarisation des Aktionspotentials unterstützt.

4.3.5 Bestimmung von ΔV_{max} und τ als Funktion der Konditionierungsdauer in K-freier Lösung

Durch Bespülung der Präparate für unterschiedliche Zeiten mit K-freier Lösung konnte nach Rückkehr auf Tyrodelösungen mit 5.4 mM KCl eine Hyperpolarisation des Membranpotentials ausgelöst werden. Abb. 24 zeigt die maximalen Potentialdifferenzen nach Konditionierungszeiten der Präparate von 1 bis 30 Minuten in K-freier Lösung. Auf der Ordinate ist die maximale Potentialdifferenz ΔV_{max}, auf der Abszisse die Konditionierungszeit in Minuten dargestellt. Nach kurzer Zeit in K-freier Lösung ($\sim$1 Min.) betrug die maximale Potentialdifferenz zwischen Ruhemembranpotential und maximalem Potential beim Wechsel auf 5.4 mM KCl-Tyrodelösung 8.6 mV. Diese Potentialdifferenz wird auf passive Änderungen der Membraneigenschaften aufgrund der K_o-Änderung zurückgeführt (vgl. Abb. 15).

Bei Konditionierungszeiten zwischen 10 und 30 Minuten ergaben sich für ΔV_{max} Werte zwischen 15 und 18 mV, daraus folgt, daß bereits nach 10-minütiger Konditionierung der Präparate maximale Hyperpolarisationen erreicht werden. Um einen meßbaren Beitrag der Na-K-Pumpe zur Höhe des Membranpotentials zu erreichen, ist eine Konditionierungszeit von 10 Min. in K-freier Lösung ausreichend.

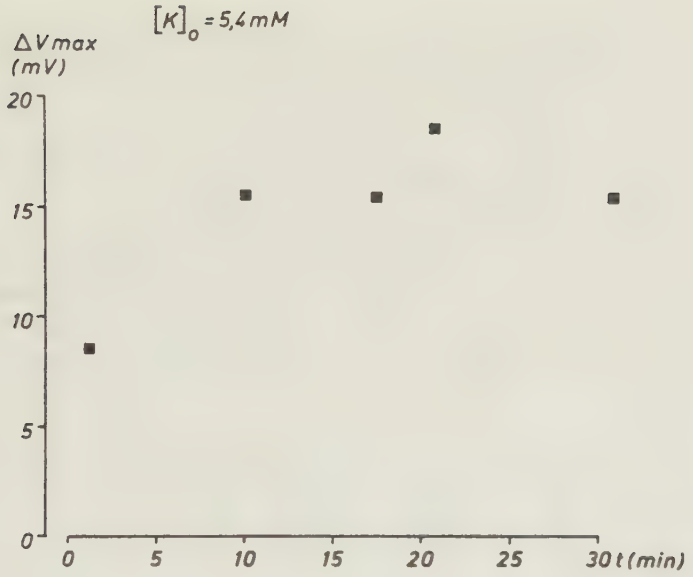


Abb. 24: Maximale Potentialdifferenz ΔV_{max} als Funktion der Konditionierungszeit t der Trabekelpräparate in K-freier Lösung nach dem Wechsel auf Tyrodelösung mit 5.4 mM K_o bei 34° C.
Die Meßwerte wurden durch eine intrazelluläre Messung an einer Herzmuskelzelle bestimmt.
ΔV_{max} enthält auch einen passiven Anteil aufgrund der K-Diffusion im Organbad und im Extrazellulärraum.

Ordinate: maximale Potentialdifferenz in mV
Abszisse: Konditionierungszeit des Präparates in K-freier Lösung in Min.

Die Zeitkonstanten der Depolarisation nach der Konditionierung wurden aus der halblogarithmischen Darstellung der Meßwerte der Einzelversuche (vgl. Abb. 15) bestimmt. Die Experimente ergeben nach einer Bespülungszeit der Präparate von 10 Min. mit K-freier Lösung bei Rückkehr auf 5.4 mM K-haltige Tyrodelösung einen Mittelwert von $\tau = 3.5 \pm 0.17$ Min. (n = 40). Die Zeitkonstanten τ als Funktion der Konditionierungszeiten nach dem Wechsel auf Standardtyrodelösung zeigt Abb. 25. Auf der Ordinate ist die Zeitkonstante τ in Minuten, auf der Abszisse ist die Konditionierungszeit der Trabekelpräparate in K-freier Lösung in Minuten dargestellt. Die Abb. gibt die Zeitkonstanten von zwei Präparaten (● , ■), die nacheinander für 1.0, 10, 15 und/oder 16, 20 und 30 Minuten mit K-freier Lösung konditioniert wurden, wieder. Der Mittelwert (▲) der Zeitkonstanten von n = 40 Versuchen ist ebenfalls in der Abb. 25 dargestellt. Die Abb. belegt, daß die Zeitkonstante für Konditionierungsdauern zwischen 10 und 30 Min. konstant ist.

Der Einfluß der Konditionierungsmethode auf die Zeitkonstante wurde untersucht durch eine Unterkühlung der Präparate bei 6° C für ca. 11 Min. in 1.35 mM K-haltiger Tyrodelösung. Abb. 26 zeigt eine fortlaufende intrazelluläre Registrierung des Membranpotentials beim Abkühlen, während der Unterkühlung sowie beim Wiedererwärmen des Trabekelpräparates. Nach dem Wechsel auf die kalte Badlösung depolariserte das Potential innerhalb von 1.3 Min. auf -56 mV, während der Unterkühlung bei 6° C und K_o = 1.35 mM blieb dieses Potential bestehen. Innerhalb von zwei Minuten nach dem Umschalten auf 5.4 mM K-haltige Lösung bei 34° C nahm das Potential um 13 mV über das Membranpotential unter Standardbedingungen hinaus zu. Diese Hyperpolarisation ging mit der Zeitkonstanten τ = 3.7 Min. auf den Ruhepotentialwert zurück. Das relativ hohe Membranpotential in Standardtyrodelösung im Fließgleichge-

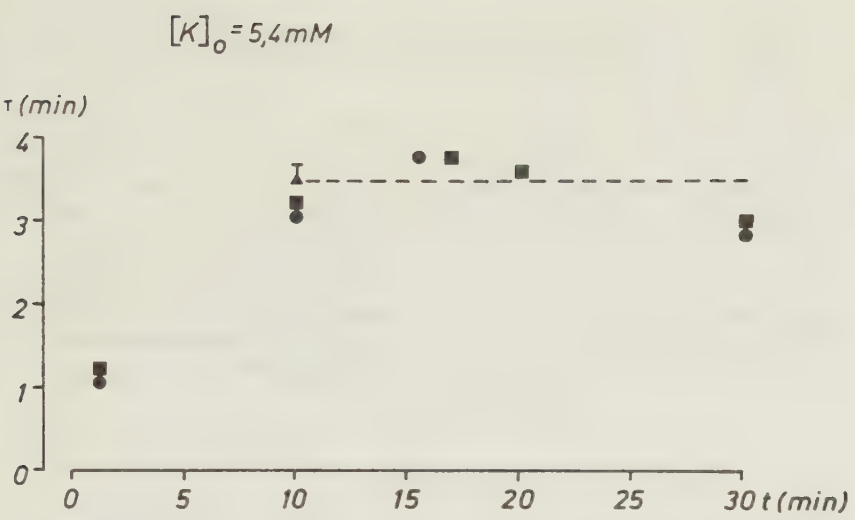


Abb. 25: Darstellung der Zeitkonstanten τ als Funktion der Zeit in K-freier Lösung nach dem Wechsel auf Tyrodelösung mit 5.4 mM K_o bei T 34° C.
Die Meßpunkte (● , ■) geben die Zeitkonstanten von kontinuierlichen Registrierungen an zwei Präparaten wieder. Der Mittelwert (▲) der Zeitkonstanten nach einer Konditionierungszeit von 10 Min. von n = 40 Versuchen ist angegeben. Die gestrichelte Horizontale erleichtert den Vergleich der Zeitkonstanten.

Ordinate: Zeitkonstante τ der Abnahme des Membranpotentials in Min.

Abszisse: Konditionierungszeit in K-freier Lösung in Min.

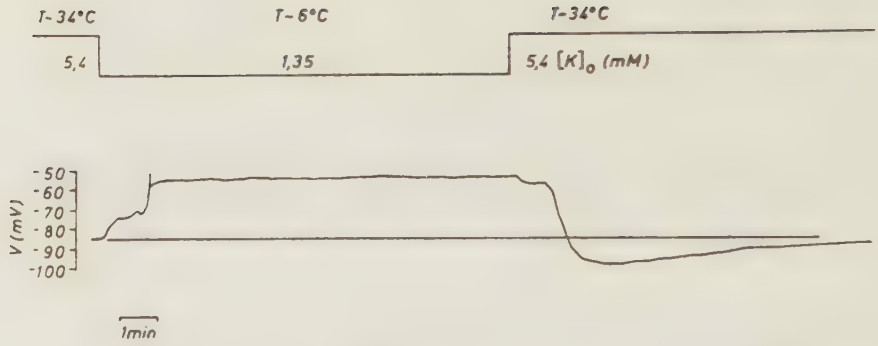


Abb. 26: Fortlaufende intrazelluläre Registrierung des Membranpotentials eines Meerschweinchentrabekelpräparates. Das Präparat wurde 10.9 Min. mit Tyrodelösung 1.35 mM K_o bei 6° C bespült und anschließend in Standardtyrodelösung bei 34° C wiedererwärmt.
Die durchgezogene Horizontale gibt das Potential unter Standardbedingungen an. Die Versuchsbedingungen sind schematisch am oberen Bildrand angegeben.
Zeitkonstante: τ = 3.7 Min.

Ordinate: Membranpotential in mV
Abszisse: Zeitmaßstab 1 Min.

wicht kann bei dieser Messung auf den Einfluß eines nicht genau bestimmten Elektrodenspitzenpotentials zurückzuführen sein.

In einem vorausgegangenen Kontrollversuch am gleichen Präparat (11.7 Min. K-freie Lösung, T 34° C) ging die Hyperpolarisation mit τ = 4.3 Min. zurück. Die Abweichung beider Werte für τ beträgt 14 %, möglicherweise ist die Abweichung auf eine veränderte Stoffwechsellage des Präparates zurückzuführen. Die nahezu identischen τ Werte weisen darauf hin, daß die Eigenschaften des hyperpolarisierenden Mechanismus durch unterschiedliche Konditionierungsmethoden kaum beeinflußt werden.

4.3.6 Die Zeitkontante τ als Funktion der K_o

Der Zeitverlauf der K-aktivierten Antwort nach Konditonierung der Präparate wurde in Abhängigkeit von der K_o-Konzentration der Badlösung untersucht. Die Dauer der Konditionierung betrug bei diesen Experimenten einheitlich 10 Minuten. Die Abb. 27 zeigt die Zeitkonstanten als Funktion von K_o nach der Konditionierungsphase. Die ermittelten Zeitkonstanten sind auf der Ordinate in Minuten, die K-Konzentration der Badlösung ist auf der Abszisse in mM angegeben. Bei K_o = 8 mM betrug die Zeitkonstante 2.4 Min.,bei 5.4 mM K_o 3.8 Min. und bei 1 mM K_o erreichte die Zeitkonstante den Wert 11.1 Minuten.

Für die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion gilt die Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 2.1.1.13),und die Ableitung der Zeitkonstanten τ als Funktion von K_o (s. Ziff. 2.2.2) ergibt Gl. 2.2.3.6:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{\frac{1}{\tau_{max}} \cdot [K]_o}{K_{me} + [K]_o}$$

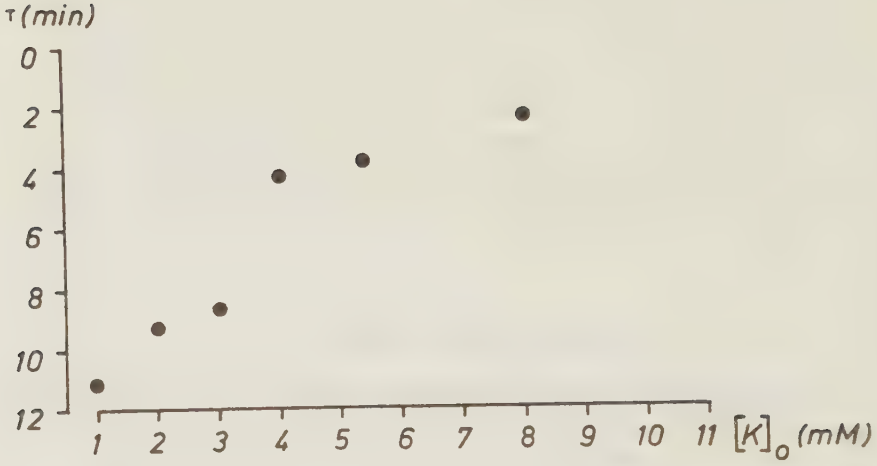


Abb. 27: Zeitkonstante τ der K-aktivierten Antwort als Funktion der extrazellulären K-Konzentration. Konditionierung in K-freier Lösung: 10 Min.

Ordinate: Zeitkonstante τ in Min.
Abszisse: K-Konzentration der Badlösung in mM

Die Gleichung stellt den mathematischen Zusammenhang zwischen der Zeitkonstanten τ und K_o her. Durch die Auftragung von τ als Funktion von $1/K_o$ kann die Halbsättigungskonstante K_{me} der K-induzierten Hyperpolarisation am Arbeitsmyokard des Meerschweinchenherzens ermittelt werden. Die Abb. 28 zeigt in einer Darstellung nach Lineweaver & Burk (vgl. Gl. 2.1.2.3) die Bestimmung von K_{me} durch doppelt-reziproke Auftragung von $1/k = \tau$ als Funktion von $1/K_o$. Auf der Abszisse ist der Kehrwert der K-Konzentration der Badlösung in mM^{-1} aufgetragen. Die Meßwerte ergeben in derDarstellung angenähert eine Gerade ($r = 0.863$) mit dem Ordinatenschnittpunkt $\tau = 2.8$ Min., und es resultiert ein K_{me}-Wert (elektrophysiologisch) der K-induzierten Hyperpolarisation von 3.4 mM.

Die Auftragung der Meßwerte nach EISENTHAL & CORNISH-BOWDEN (1974) liefert ein direktes lineares Diagramm zur Analyse der kinetischen Daten, Abb. 29 zeigt die Graphik des Auswerteverfahrens. Auf der Ordinate ist die Geschwindigkeitskonstante k in $(Min.^{-1})$ (s. Gl. 2.2.3.6), auf der Abszisse ist die K-Konzentration der Badlösung in mM aufgetragen. Zur konstruktion des Diagramms (s. Ziff. 2.1.3) wurde die K-Konzentration an der Ordinate gespiegelt aufgetragen und die Geraden mit Hilfe der Koordinatenschnittpunkte k und $-K_o$ jedes Wertepaares eingezeichnet. Die Transformation der Sättigungsfunktion nach EISENTHAL & CORNISH-BOWDEN (1974) ergibt die Funktion (Gl. 2.1.3.3):

$$v_{max} = \frac{v}{[S]} \cdot K_m + v$$

Aus Abb. 29 gehen 6 Schnittpunkte hervor (x_1 bis x_6), eine Angabe des wahrscheinlichsten $\bar{K}_m$-Wertes erfolgt durch die Bildung des Mittelwertes; aus den Meßdaten ergibt sich $\bar{K}_m$ zu 2.1 ± 0.68 mM K_o. Die Auftragungsweise der Abb. 29 bietet den Vorteil der gleich starken Wichtung aller Meßwerte und

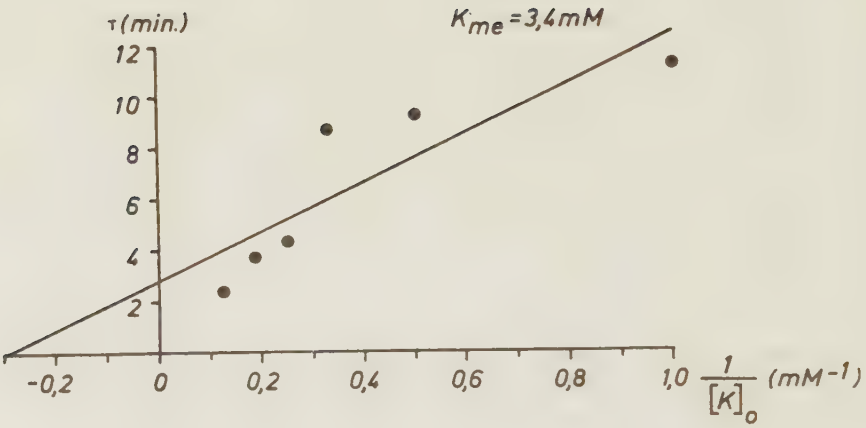


Abb. 28: Zeitkonstante τ der K-aktivierten Antwort in Abhängigkeit von der extrazellulären K-Konzentration.
Konditionierungszeit in K-freier Badlösung 10 Min.
Die doppelt-reziproke Auftragung ergibt den K_{me}-Wert von 3.4 mM (r = 0.863).

Ordinate: τ in Min.
Abszisse: Kehrwert der K_o in (mM^{-1})

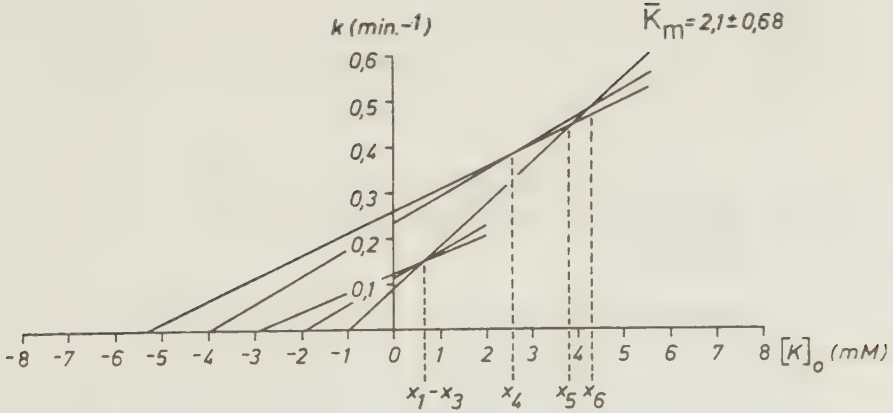


Abb. 29: Direktes lineares Diagramm der Geschwindigkeitskonstanten k als Funktion der K-Konzentration in der Badlösung.
(Diagramm nach EISENTHAL & CORNISH-BOWDEN 1974).
Der Mittelwert der Schnittpunkte x_1 bis x_6 ist $\bar{K}_m = 2.1 \pm 0.68$ mM.
Ordinate: Geschwindigkeitskonstante k in Min.$^{-1}$
Abszisse: K-Konzentration in der Badlösung in mM

die Möglichkeit, diejenigen Werte, die mit großen Fehlern behaftet sind, leicht zu erkennen. Der Vergleich der nach zwei unterschiedlichen Verfahren berechneten Halbsättigungskonstanten K_{me} und $\bar{K}_m$ der K-aktivierten Membranantwort ergibt eine Differenz von 1.3 mM. Für die Bestimmung einer kinetischen Größe liegt diese Differenz im Bereich einer zufriedenstellenden Meßgenauigkeit. Die Vorteile der direkten linearen Auftragung nach EISENTHAL & CORNISH-BOWDEN (1974) machen den Wert von 2.1 $\pm$ 0.68 mM als Halbsättigungskonstante wahrscheinlicher.

4.3.7 Bestimmung des HILL-Koeffizienten aus den Geschwindigkeitskonstanten der K-aktivierten Zellantwort

Durch Bespülung der Präparate mit K-freier Badlösung wird die Na-K-Pumpe gehemmt und Na_i erhöht (DEITMER & ELLIS 1978). Durch Zugabe K-haltiger Tyrodelösung wird die Na-K-Pumpe reaktiviert. Dabei hyperpolarisiert das Membranpotential der Herzmuskelzellen zunächst und depolarisiert danach mit der Geschwindigkeitskonstanten $k = 1/\tau$ (exponentieller Abfall) auf das Ruhemembranpotential. Die Bestimmung der Zeitkonstanten k der K-aktivierten Antwort liefert durch eine HILL-Analyse eine Abschätzung der K-Bindungsstellen am Carriermolekül. Die Ableitung der HILL-Gleichung 2.2.4.2 ist unter Ziff. 2.2.4 angegeben:

$$\frac{k}{k_{max}} = \frac{[K]_o^n}{K'+[K]_o^n} \qquad 2.2.4.2$$

Ob mehrere (n) Bindungsstellen am Carriermolekül für K-Ionen vorliegen (vgl. Ziff. 2.1.4), d. h. ob ein sigmoider Funktionszusammenhang zwischen der Geschwindigkeitskonstanten k und $1/K_o$ besteht, wird anhand der Abb. 30 überprüft.

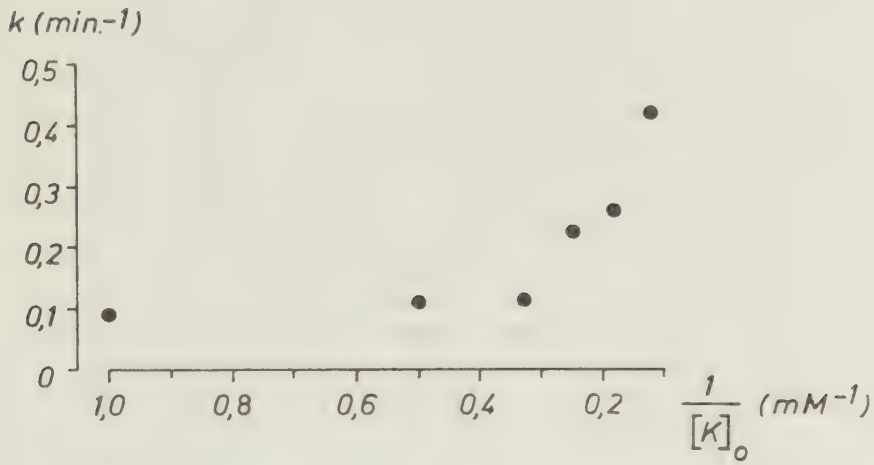


Abb. 30: Geschwindigkeitskonstanten k der K-aktivierten Membranantwort als Funktion der K-Konzentration in der Badlösung. Nach 10 Min. Konditionierung in K-freier Tyrodelösung wurde auf Tyrodelösung mit unterschiedlicher K_o gewechselt. Die Geschwindigkeitskonstante der Depolarisation $k = 1/\tau$ wurde errechnet.

Ordinate: Geschwindigkeitskonstante k in $Min.^{-1}$
Abszisse: reziproker Wert der K_o in mM^{-1}

Sie zeigt die Geschwindigkeitskonstanten k als Funktion der zur Aktivierung der Na-K-Pumpe verwendeten K-Konzentration der Badlösung. Auf der Ordinate ist die Geschwindigkeitskonstante k pro Min., auf der Abszisse der Kehrwert der K-Konzentration in mM^{-1} aufgetragen. Bei 1 mM K_o hat die Geschwindigkeitskonstante den Wert 0.09 $Min.^{-1}$, im Bereich von 3 mM $\leq K_o \leq$ 8 mM ist die Abhängigkeit der Konstanten k von K_o sehr steil und erreicht bei K_o = 8 mM den Wert 0.42 $Min.^{-1}$. Dieser Kurvenverlauf deutet auf einen sigmoiden Funktionszusammenhang hin. Aus der Darstellung der Meßwerte in einem HILL-Diagramm kann aus den elektrophysiologischen Daten auf die Zahl der K-Bindungsstellen geschlossen werden. Abb. 31 zeigt das HILL-Diagramm (vgl. Ziff. 2.1.4, Gl. 2.1.4.7) konstruiert aus den Geschwindigkeitskonstanten k der Abnahme der K-aktivierten Antwort als Funktion der K-Konzentration der Badlösung. Auf der Ordinate ist das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten k zur Differenz aus maximaler Geschwindigkeitskonstanten minus aktueller Geschwindigkeitskonstanten logarithmiert aufgetragen. Die Abszisse zeigt den Logarithmus der K-Konzentration der Badlösung. Die Gerade hat die Steigung h = 2.1,und die Meßpunkte korrelieren mit der Geraden mit r = 0.925.

Aus dem HILL-Diagramm kann geschlossen werden, daß mindestens zwei Bindungsstellen für K-Ionen an der Na-K-Pumpe vorliegen.

Insgesamt stehen die dargestellten Versuchsergebnisse dieser Untersuchung in Übereinstimmung mit dem Konzept, daß die Na-K-Pumpe einen direkten Beitrag zur Höhe des Membranpotentials leistet.

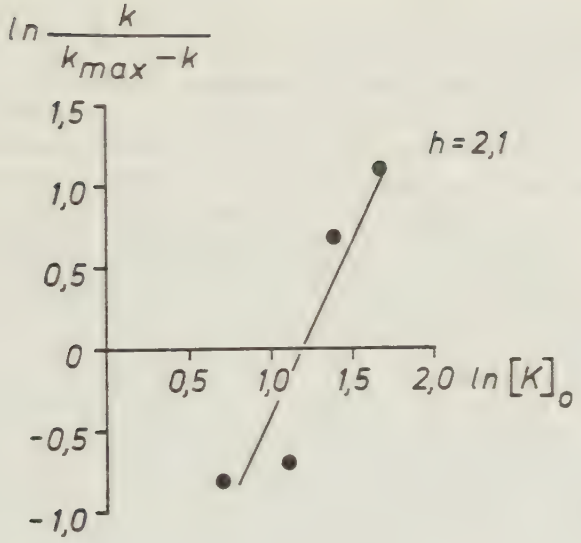


Abb. 31: Hill-Diagramm der Geschwindigkeitskonstanten $k = 1/\tau$
Die Auftragung erfolgte nach der Hill-Gleichung 2.2.4.2 (vgl. auch Ziff. 2.1.4)
Hill-Koeffizient h = 2.1;
Korrelationskoeffizient r = 0.925
Ordinate: Logarithmus $k/(k_{max}-k)$; k bedeutet die aktuelle und k_{max} die maximale Geschwindigkeitskonstante
Abszisse: Logarithmus der K_o; K_o in mM

5. Diskussion

Untersuchungen zum herzglykosidhemmbaren K-Transport werden an Herzmuskelzellen des Arbeitsmyokards durch die komplizierte morphologische Struktur der Herzmuskelpräparate erschwert. Die Kenntnisse der Eigenschaften des Transportes an experimentell leichter zugänglichen Präparaten wie z. B. Erythrozyten, Skelettmuskulatur und Zellen aus dem Reizleitungsgewebe des Herzens sind daher weiter fortgeschritten als an Zellen des Arbeitsmyokards. Für Erythrozyten liegen beispielsweise gesicherte quantitative Untersuchungen zur Abhängigkeit des Na-K-Transports von den asymmetrisch über der Zellmembran verteilten Kationen Na und K vor (GLYNN 1956), da an diesen Präparaten das intrazelluläre Ionenmilieu gut kontrolliert werden kann. Die Bereitstellung der Energie aus dem Zellstoffwechsel in Form von ATP für den Ionentransport gegen die Gradien ten ist an Erythrozyten detailliert untersucht (s. GLYNN & KARLISH 1976).

In einem Übersichtsartikel setzt SKOU (1965) die Eigenschaften des (Na + K)-Mg-abhängigen Enzymsystems in bezug zum aktiven Na- und K-Transport über der Zellmembran. Die Zusammenstellung der Literatur ergibt, daß die ATPase Aktivität und der Na-K-Transport an vielen Präparaten übereinstimmende Charakteristika aufweisen (s. SKOU 1965, vgl. Abb.1)

5.1 Die Aktivierung des Ouabain-hemmbaren K-Transportsystems

Untersuchungen mit Radioisotopen geben Aufschluß über die unidirektionalen Ionenfluxe über der Zellmembran. Für die Bestimmung der aktiven Komponente des unidirektionalen

Ionenfluxes reicht die Kenntnis des Gesamtfluxes nicht aus, da die passiven Ionenbewegungen einen Beitrag zum Gesamtflux liefern. Durch spezifische Hemmung des aktiven Transportsystems kann die Größe der passiven Fluxe ermittelt werden, damit auch die aktive Komponente des Transportes.

An Herzmuskelpräparaten bietet die Verwendung von Rb-Ionen den Vorteil einer einfachen Methode, um den unidirektionalen Influx unter verschiedenen Bedingungen bestimmen zu können. Da die intrazelluläre Rb-Konzentration zu Versuchsbeginn sehr niedrig ist ($Rb_i \approx 0$ mM), ist der passive Rb-Efflux zu vernachlässigen. Die Größe der aktiven und passiven Rb-Aufnahme kann leicht durch flammenphotometrische Bestimmung der Konzentrationen erfolgen. Die lineare Abhängigkeit der passiven Rb-Aufnahme unter 10^{-4} M Ouabain am Meerschweinchenvorhof (s. Abb. 6) ist vergleichbar mit der linearen ^{42}K-Aufnahme am Froschskelettmuskel unter 10^{-4} M Strophanthidin (KENNEDY & DeWEER 1977).

Der aktive Rb-Influx in Meerschweinchenvorhofpräparate als Funktion der extrazellulären Rb-Konzentration wurde von GLITSCH & PUSCH (in: GLITSCH 1979) untersucht. Die Rb-Aufnahme wurde ohne vorhergehende Unterkühlungsphase im steady state der Zellen bestimmt. Ein Vergleich dieser Werte mit der Rb-Aufnahme in Vorhofpräparate mit einer erhöhten intrazellulären Na-Konzentration (s. Tab. 3) zeigt, daß die aktive Rb-Aufnahme um etwa 27 % im untersuchten Konzentrationsbereich von 0.67 bis 10.8 mM Rb_o in den Na-reichen Präparaten erhöht ist.

Wie weit das erhöhte Membranpotential der durch Unterkühlung konditionierten Präparate die Rb-Aufnahme beeinflußt, kann aufgrund der vorliegenden Experimente nicht angegeben werden. Jedoch belegen die Versuchsergebnisse, daß Rb-Ionen

K-Ionen bei der Stimulation des aktiven Na-Transports an Arbeitsmyokardzellen ersetzen können. Für das Reizleitungsgewebe des Säugerherzens wurde dieser Nachweis ebenfalls erbracht (Schafspurkinjefasern: EISNER & LEDERER 1980a).

Aus den kinetischen Größen der Ouabain-hemmbaren Rb-Aufnahme in das Meerschweinchenherzmuskelgewebe folgt eine nur etwas geringere oder aber gleiche Affinität des Carriermoleküls für Rb und K. Die ermittelten K_m-Werte für den aktiven Rb- und K-Transport zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Werten für die Aktivierung der ATP-Hydrolyse der Transport-ATPase durch K und Rb. Für die Hydrolyse von ATP durch das Transport-ATPase-System aus Krabbennervenhomogenaten ist im Medium die Anwesenheit von Na und Mg erforderlich, die Aktivierung wird durch NH_4, K, Rb und Cs mit abnehmender Effektivität in der angegebenen Reihenfolge erreicht. Als K_m-Werte wurden bestimmt: K: 1.8 mMol/l, Rb: 2.1 mMol/l (SKOU 1960). Diese relative Effektivität der Kationen bei der ATP-Spaltung wurde an Präparaten der (Na + K)-ATPase aus dem Meerschweinchenherzen bestätigt. Die halbmaximale Aktivierung der ATP-Hydrolyse wurde zu 2.0 mM K_o bestimmt und die Hemmung durch Herzglykoside gezeigt (PORTIUS & REPKE 1967). Die Enzympräparation aus dem Kaninchenventrikel erreichte die halbmaximale Sättigung bei K_o = 1.0 mM (Na_o: 80 mM, pH: 6.7, T 37° C) und zeigte eine vollständige Hemmung bei einer Ouabainkonzentration von 10^{-5} M (AUDITORE & MURRAY 1962). Portius und Repke (1967) kommen zu dem Schluß, daß die (Na-K)-ATPase der Herzmuskelzellmembran entweder das charakterisierte Transportsystem ist oder aber zumindest einen Teil davon darstellt.

Aus der Tab. 3 geht hervor, daß bei Rb_o 2.7 mM die Zellen gleichzeitig mit Rb auch K aufgenommen hatten; das aufgenommene K stammt vermutlich aus dem Extrazellulärraum der

Präparate. Diese Kompetition der Kationen um das Carriermolekül bestätigt die Annahme, daß Rb und K durch die Membran in Kombination mit demselben Carriermolekül transportiert werden. Damit könnte K einen kompetitiv hemmenden Effekt auf die Rb-Aufnahme haben und der K_{mRb}-Wert dadurch zu hoch bestimmt werden.

Da für die Größe der aktiven K (Rb)-Aufnahme in Herzmuskelzellen bei konstanter K_o (Rb_o) die Höhe der intrazellulären Na-Konzentration bestimmend ist (s. Abb. 8), kann die passive Na-Aufnahme über eine Veränderung von Na_i die Größe der aktiven K(Rb)-Aufnahme beeinflussen. An Meerschweinchenvorhofpräparaten wurde der passive Na-Influx als Funktion von Na_o an Na-verarmten Präparaten untersucht und der Na-Influx als lineare Funktion von Na_o bestimmt. Der aktive Na-Efflux war über einen Konzentrationsbereich von 0 bis 137 mM von Na_o unbeeinflußt (GLITSCH et al. 1976). Bei den eigenen Untersuchungen (Na_o = 145 mM) kann aufgrund dieser Befunde der passive Na-Influx in derselben Größe und als konstant angenommen werden.

Die Hemmung des Na-Auswärtstransportes und die gleichzeitige Hemmung der ^{42}K- bzw. ^{86}Rb-Aufnahme durch Ouabain (5×10^{-3} M bzw. 3×10^{-4} M) in Herzmuskelpräparate von Ratten und Meerschweinchen wurden von AKERA und Mitarbeitern (1981) untersucht. Im Gegensatz zur Annahme dieser Autoren wird aufgrund der Experimente der Versuchsserie I B als die bestimmende Größe der Rb- und K-Aufnahme in die Herzmuskelzellen nicht der Na-Influx, sondern die intrazelluläre Na-Konzentration angesehen.

Im Fließgleichgewicht der Zelle ändert sich die intrazelluläre Na-Konzentration nicht (s. Tab. 2), da der passive Einstrom von Na-Ionen durch den aktiven Na-Efflux kompensiert wird. Für Herzmuskelpräparate wurde durch PAGE &

STORM (1965) am Katzenpapillarmuskel nachgewiesen, daß bei hinreichender K_o ($K_o \geqq 2.5$ mM) in der Tyrodelösung die Na- und K-Gradienten über der Zellmembran aufrechterhalten werden, d. h. im steady state der Zelle wird der Na-Influx durch den Na-Auswärtstransport ausgeglichen. Bei einer Erhöhung von Na_i hingegen wurde eine Stimulation des aktiven Na-Efflux am Skelettmuskel des Frosches durch K_o und Rb_o (ADRIAN & SLAYMAN 1966) und am Meerschweinchenvorhof durch K_o nachgewiesen (GLITSCH et al. 1976).

Die Methode der Na_i-Beladung der Herzmuskelzellen (Konditionierung) wurde auch in dieser Arbeit angewandt, und die Experimente liefern Daten zu Eigenschaften des Transportmechanismus.

Mit dem Konzept eines membrangebundenen Carriermoleküls, das unterschiedliche Affinitäten für Na- und K-Ionen besitzt, stehen die experimentellen Befunde in guter Übereinstimmung. Die Sättigungskinetik, die die Abhängigkeit der Rb-Aufnahme von Rb_o bei erhöhter Na_i zeigt (Abb. 6), sowie die Rb-Aufnahme als Funktion von Na_i bei konstanter Rb_o (Abb. 8) erfüllen die Bedingungen, die an einen carriervermittelten Transport gestellt werden.

Die Aktivität der Na-K-Pumpe als Funktion von Na_i und K_o wurde quantitativ am Meerschweinchenvorhofpräparat untersucht und die halbmaximale Aktivierung der Pumpe bei $K_o = 0.2$ mM gemessen (GLITSCH et al. 1976); in der vorliegenden Arbeit ergaben die Experimente am gleichen Präparat mit derselben Methode einen K_m-Wert von 1.1 mM K_o. Die niedrigen K_m-Werte sprechen für eine hohe Affinität des Transportsystems für K-Ionen, die Untersuchungen des aktiven Na-Efflux als Funktion von K_o an unterschiedlichen Herzmuskelpräparaten (Froschvorhof: HAAS et al. 1967, Purkinjefasern: BOSTEELS & CARMELIET 1972) ergeben, daß der aktive Na-Transport bereits bei niedrigen K_o stark aktiviert ist.

Bei der kritischen Wertung der kinetischen Daten des Na-K-Transportes muß berücksichtigt werden, daß durch die Na-Beladung der Zellen während der Konditionierung die intrazelluläre Ca^{++}-Konzentration erhöht wird (s. REUTER 1974). Bei der Reaktivierung der Na-Pumpe kann daher die Größe des aktiven Na-Efflux wegen des nicht erfaßten Na-Ca-Austausches unterschätzt werden. Auch unter diesem Gesichtspunkt stellt die Bestimmung der Ouabain-hemmbaren Rb-Aufnahme in Herzmuskelgewebe ein günstiges Maß der Na-K-Pumpaktivität dar.

Durch die Unterkühlung von Präparaten in Lösungen mit unterschiedlicher Na-Konzentration wurde Na_i variiert (Versuchsserie I B). Dabei wurde Ca_o bei reduzierter Na_o verringert (s. Tab. 1), um zusätzliche Effekte durch den Na-Ca-Austausch auf den Na-K-Transport gering zu halten (s. REUTER 1974). Da Herzmuskelpräparate Ca-Konzentrationen im extrazellulären Milieu kleiner 0.2 mM schlecht tolerieren, wurde diese Konzentration in der zur Unterkühlung verwendeten Tyrodelösung nicht unterschritten.

5.2 Bestätigung von 3 Na_i- und 2 K_o-Bindungsstellen am Na-K-Transportsystem des Arbeitsmyokards

Ein Hinweis auf die Anzahl der Kationenbindungsstellen am Carriermolekül wurde an Froschskelettmuskelpräparaten erhalten. Die experimentellen Befunde am M. sartorius des Frosches ergeben, daß zur Translokation des Carriers durch die Membran die Bindungsstellen mit 3 Na^+ besetzt sein müssen (SJODIN 1971).

Aus der sigmoiden Abhängigkeit der Rb-Aufnahme von der Na_i (s. Abb. 9) ist die Annahme kooperativer Wechselwirkungen von Na-Ionen an den Bindungsstellen des Carriermoleküls wahrscheinlich (s. Ziff. 2.1.4). Es wird dabei von der Voraussetzung ausgegangen, daß die Eigenschaften der Bindungsstellen durch Änderungen von Na_i und K_o nicht beeinflußt werden (s. KOTYK 1977).

An Riesenaxonen des Tintenfisches ist die Aktivierung der Na-Pumpe eine sigmoide Funktion von K_o (BAKER et al. 1969) und gibt damit den Hinweis auf die Kooperativität der Bindungsstellen.

An großen Muskelfasern von Meereskrebsen (Balanus nubilus) können die Eigenschaften der Na-K-Pumpe mit einer intrazellulären Perfusionstechnik studiert werden. Diese Perfusionstechnik bietet den Vorteil, die Zusammensetzung der intrazellulären Lösung ständig kontrollieren zu können. Der ^{22}Na-Efflux als Funktion von Na_i (und der intrazellulären ATP-Konzentration) konnte mit Hilfe dieser Technik untersucht werden (NELSON & BLAUSTEIN 1980). Es wurde gezeigt, daß der ^{22}Na-Efflux eine Funktion von K_o ist und durch 10^{-4} M Ouabain gehemmt wird.

In Experimenten, bei denen Na_i von ~15 mM auf ~55 mM erhöht wurde, zeigte sowohl der K-abhängige als auch der Ouabain-hemmbare Na-Efflux eine sigmoide Abhängigkeit von Na_i. Die Analyse der Meßwerte in einem HILL-Diagramm ergab für die Balanus-Muskelfasern einen HILL-Koeffizienten von h = 3.5. Der Schluß, daß an der intrazellulären Na-Bindungsstelle des Transportsystems mehr als ein Na-Ion benötigt wird, um die Na-K-Pumpe zu aktivieren, erscheint gerechtfertigt. Der HILL-Koeffizient steht mit dem Modell der kooperativen Wirkung von 3 Na-Ionen am Transportsystem beim Na-Auswärtstransport in Übereinstimmung (NELSON & BLAUSTEIN 1980).

Am Säugerherzmuskel wurde der Gesamt - Na-Efflux als sigmoide Funktion der intrazellulären Na-Konzentration mit einer halbmaximalen Aktivierung bei $Na_i \sim 20$ mM bestimmt (CARMELIET 1964). Für das Meerschweinchenvorhofpräparat ergibt sich aus der Kinetik der Rb-Aufnahme als Funktion der Na_i eine halbmaximale Aktivierung bei Na_i = 8.7 mMol/l F.W. (s. Abb.9). Da die intrazelluläre Na-Konzentration des Meerschweinchenvorhofes im steady state zu etwa 30 mMol/l F.W. bestimmt wurde (s. Tab. 2), arbeitet die Na-Pumpe des Meerschweinchenherzens bereits annähernd im Sättigungsbereich. Dieser Wert kann mit der Flammenphotometrie möglicherweise zu hoch bestimmt worden sein, da am Meerschweinchenherzen mit Na-sensitiven Elektroden eine a^i_{Na} =1o.4 mM gemessen wurde (GLITSCH, PUSCH & VASSORT 1979). Allerdings ist die Aktivierung des Transportsystems im Konzentrationsbereich bis $Na_i \sim 5o$ mMol/l F.W. gezeigt worden (GLITSCH et al.1976).

Die Messungen der Ouabain-hemmbaren Rb-Aufnahme als Funktion von Na_i am Arbeitsmyokard des Meerschweinchens ergaben einen HILL-Koeffizienten von 3.5 (s. Abb. 10). Als Maß der Na-Pumpaktivität wird die Ouabain-hemmbare Rb-Aufnahme angesehen, da für den Transportzyklus eine Proportionalität zwischen Na-Auswärtstransport und Rb-Aufnahme besteht. Ähnlich wurde am Erythrozyten aus der aktiven K-Aufnahme als Funktion von Na_i durch die Auswertung eines HILL-Diagramms auf die Anzahl der Na-Bindungsstellen geschlossen (ROLAND & DUNHAM 1980).

Zur Abschätzung der intrazellulären Na-Bindungsstellen am Na-K-Transportsystem des Meerschweinchenherzens wurde Kooperativität am Carriermolekül angenommen. Die gute Übereinstimmung (r = 0.987) der experimentellen Daten mit den theoretischen Überlegungen läßt aus der Steigung der Geraden (Abb. 10) drei Bindungsstellen für Na^+ wahrscheinlich erscheinen.

Sowohl die Bestimmung des HILL-Koeffizienten direkt aus dem unidirektionalen ^{22}Na-Efflux perfundierter Balanus-Muskelfasern (NELSON & BLAUSTEIN 1980) als auch seine Ableitung indirekt aus der K-Aufnahme in Erythrozyten (ROLAND & DUNHAM 1980) ergeben übereinstimmend mehr als eine intrazelluläre Na-Bindungsstelle am Na-K-Transportsystem. Bei allen bisher untersuchten Präparaten werden 3 bis 4 Na-Bindungsstellen am Na-K-Transportsystem als wahrscheinlich angenommen (LIT.: bei SKOU 1965, 1975).

Aus den HILL-Koeffizienten der aktiven K- und Rb-Aufnahme von h = 1.1 (s. Abb. 11) kann auf 2 K_o- bzw. Rb_o-Bindungsstellen am Carriermolekül geschlossen werden.

Aus den Geschwindigkeitskonstanten des Abfalls der Hyperpolarisation als Funktion von K_o (Abb. 30) liefert der HILL-Koeffizient h = 2.1 (Abb. 31) den Hinweis auf zwei K_o-Bindungsstellen am Carriermolekül an der Außenseite der Zellmembran. Zusammen mit der Annahme von 3 Na-Bindungsstellen (Abb. 10) steht das Konzept eines Kopplungsverhältnisses von 3Na : 2K am Meerschweinchenherzmuskelpräparat in guter Übereinstimmung mit derselben Annahme des Kopplungsverhältnisses, welches der Charakterisierung der elektrogenen Na-Pumpe am Reizleitungsgewebe des Schafsherzens zugrunde gelegt wird (EISNER & LEDERER 1980a).

Durch eine sigmoide Bindungscharakteristik ist eine Feinregulation biologisch relevanter Größen gewährleistet; für die Na-K-Pumpe bedeutet dies, daß bei einer geringen Erhöhung von Na_i der Na-Auswärtstransport zur Aufrechterhaltung der Ionengradienten effektiv einsetzt. Die kinetische Analyse der Eigenschaften des Na-K-Transports am Arbeitsmyokard des Meerschweinchens bestätigt weitgehend das Konzept der Na-K-Pumpe, wie es an anderen Präparaten gewonnen wurde.

5.3 Der Beitrag der Na-K-Pumpe zum Membranpotential

Die Effekte der K-Pumpe auf das Membranpotential und der zugrunde liegende Mechanismus werden anhand der Ergebnisse der Versuchsserie II diskutiert.

In Abb. 2 ist das Membranpotential als Funktion von Na_i und K_o für Zellen im steady state und nach Erhöhung von Na_i dargestellt. Der herzglykosid-hemmbare Na-K-Transport hält unter Bedingungen des steady states die Na- und K-Gradienten über der Membran aufrecht.

Durch experimentelle Manipulationen kann die intrazelluläre Na-Konzentration erhöht werden, damit kann der Beitrag der Na-Pumpe zur Höhe des Membranpotentials als Funktion von Na_i an besonders geeigneten Präparaten direkt gezeigt werden. An Riesennervenzellen aus dem Abdominalganlion von Helix aspersa wurde eine Zunahme des Membranpotentials nach Injektion von Na^+-haltiger Lösung in die Zelle in K-haltiger Lösung von mehr als 30 mV gemessen. Wurde während der Hyperpolarisationsphase auf eine K-freie Badlösung gewechselt, so ging die Hyperpolarisation zurück, ebenso konnte die Hemmung der Hyperpolarisation durch Ouabain gezeigt werden (KERKUT & THOMAS 1965).

Diese Versuche bestätigen, daß nach einer Erhöhung der intrazellulären Na-Konzentration die Höhe des Membranpotentials durch einen K-aktivierten, Ouabain-hemmbaren elektrogenen Prozeß mitbestimmt wird. Mit Hilfe der voltage-clamp Technik konnte an Schneckenneuronen der von Na getragene Auswärtsstrom nach einer Na-Injektion gemessen werden, damit wurde der direkte Beitrag einer elektrogenen Na-Pumpe zum Membranpotential nachgewiesen (THOMAS 1968).

Messungen des Membranpotentials zuvor unterkühlter Meerschweinchenvorhöfe mit erhöhter Na_i ergaben beim Wiedererwärmen vorübergehend negativere Potentialwerte als unter Bedingungen des Fließgleichgewichts. Im weiteren Verlauf des Wiedererwärmens depolarisierte die Zellmembran wieder auf das Potential im steady state. Durch Unterkühlung der Präparate in Lösungen mit unterschiedlicher NaCl-Konzentration wurde Na_i der Zellen variiert. Die Messungen des Potentialverlaufes beim Wiedererwärmen ergaben, daß die Höhe der Hyperpolarisation und ihr Zeitverlauf eine Funktion von Na_i ist. Aus den Ergebnissen der Experimente wurde gefolgert, daß das Membranpotential der Präparate nach Unterkühlung durch eine Na_i-aktivierte elektrogene Na-Pumpe beeinflußt wird (GLITSCH 1972a).

Aus Abb. 12 geht hervor, daß das Membranpotential des Meerschweinchenvorhofs im Fließgleichgewicht mit Erniedrigung der extrazellulären K-Konzentration negativer wird. Die negativeren Membranpotentiale bei kontinuierlicher Registrierung im Vergleich zur statistischen Bestimmungsmethode können folgende Ursache haben. Durch das Einheilen der Mikroelektrodenspitze werden Leckströme über der Zellmembran verringert, und eine genauere Messung des Potentials wird ermöglicht.

Die kontinuierliche Registrierung des Membranpotentials ist ein Vorteil für die genaue Erfassung zeitlicher Änderungen des Membranpotentials.

HIRAOKA & HECHT (1973) benötigten lange Unterkühlungszeiten (22 - 24 Std. K_o = 1.0 mM) an Schafspurkinjefasern, um beim Wiedererwärmen der Präparate deutliche Hyperpolarisationen des Membranpotentials zu messen. Bei kontinuierlicher Registrierung am gleichen Präparat fanden GLITSCH & PUSCH (1980) nach einer Periode von 15 Minuten in K-freier Lösung eine

Zunahme der a^i_{Na} von 6 mM und bei Zugabe von K = 5.4 mM eine Hyperpolarisation des Membranpotentials von 6 mV. Nimmt man die maximale Hyperpolarisation des Membranpotentials am Meerschweinchenvorhof nach 10 Min. in K-freier Lösung bei Zugabe von K_o = 5.4 mM zu 12 mV an, so ist bei einer Halbwertszeit von $t_{1/2}$ = 2.5 Min. nach 5 Min. nur noch eine Differenz von 3 mV zum Ruhepotential meßbar. Diese Überlegung auf der Grundlage der eigenen Experimente zeigt, daß für schnelle Änderungen des Membranpotentials statistische Messungen bei geringen Potentialdifferenzen wenig geeignet sind, um gesicherte Aussagen über zeitliche Änderungen des Membranpotentials zu machen.
Nach einer Konditionierungsphase der Präparate in K-freier Lösung hyperpolarisierte das Membranpotential bei Rückkehr auf K-haltige Tyrodelösungen (Abb. 13); diese Hyperpolarisation wird auf die Aktivität der Na-K-Pumpe zurückgeführt.

Durch kontinuierliche Registrierung der intrazellulären Na-Aktivität (a^i_{Na}) an Purkinjefasern des Schafsherzens mit Na-sensitiven Glasmikroelektroden konnte der direkte Nachweis geführt werden, daß bei Bespülung der Präparate mit K-freier Lösung die intrazelluläre Na-Aktivität anstieg und bei Zugabe von K_o wieder auf den Ausgangswert zurückging (DEITMER & ELLIS 1978).

Untersuchungen am gleichen Präparat zeigten, daß das Membranpotential und die intrazelluläre Na-Aktivität nach Perioden in K-freien Lösungen mit derselben e-Funktion abnahmen. Aus der engen Korrelation beider Meßgrößen folgt, daß die Hyperpolarisation des Membranpotentials auf die Aktivität der Na-Pumpe zurückzuführen ist (GLITSCH & PUSCH 1980). An Hundepurkinjefasern konnte ein herzglykosidhemmbarer Pumpstrom gemessen werden, der auf die Aktivität der Na-Pumpe zurückgeführt wird (GADSBY & CRANEFIELD 1979a). Die direkte Messung des Pumpstromes konnte unter voltage clamp Bedingungen

bei gleichzeitiger Bestimmung der a^i_{Na} an Schafspurkinjefasern durchgeführt werden (EISNER, LEDERER & VAUGHAN-JONES 1981b). Die intrazelluläre Na-Aktivität und der Na-Pumpstrom nahmen auch in diesen Experimenten mit derselben Geschwindigkeitskonstanten ab (EISNER et al. 1981b).

Der Beitrag der elektrogenen Na-Pumpe zur Höhe des Membranpotentials kann proportional zur intrazellulären Na-Konzentration angenommen werden (GADSBY 1980b). Der passive Na-Influx ist an Purkinjefasern eine lineare Funktion von Na_o (ELLIS & DEITMER 1978) und wird wenig durch die Höhe von K_o beeinflußt (GLITSCH, KAMPMANN & PUSCH 1981). GADSBY (1980b) bestimmte Änderungen des Na-Pumpstromes unter voltage clamp-Bedingungen am Hundepurkinjefaden nach kurzer Bespülung des Präparates mit K-freier Lösung. Die halbmaximale Aktivierung der Na-Pumpe wurde bei 1 mM K_o gemessen, für Purkinjefaserpräparate des Schafsherzens wurden K_m-Werte von 10 - 12.5 mM (DEITMER & ELLIS 1978) und für Rb_o 6.3 mM (EISNER & LEDERER 1979, 1980a) angegeben. Neuere Arbeiten dieser Autoren ergeben am selben Präparat K_m-Werte für Rb_o von 1 mM bzw. 4 mM (EISNER et al. 1981a), im gleichen Bereich liegen die von GLITSCH und Mitarbeitern (1981) bestimmten K_m-Werte (1.6 - 3.7 mM K_o (Rb_o)). An Meerschweinchenvorhofpräparaten wurde die halbmaximale Aktivierung bei K_o = 1.5 mM bestimmt (GLITSCH, GRABOWSKI & THIELEN 1978).

Die in dieser Arbeit vorgelegten Versuchsergebnisse ergeben aufgrund der K- bzw. Rb-Aufnahme in die Vorhofpräparate eine halbmaximale Aktivierung bei K_o = 1.1 mM und Rb_o = 3.2 mM (Abb. 7), die elektrophysiologische Bestimmung des K_{me}-Wertes (Abb. 28, 29) liegt im Bereich zwischen 3.4 mM und 2.1 mM K_o. Ausgehend von jeweils gleicher erhöhter Na_i wird bei maximaler Aktivierung der Na-Pumpe durch $K_o \geq 5.4$ mM bei konstanter G_m ein konstanter Beitrag zur Höhe des Membranpotentials erwartet (Abb. 24).

Bei Bespülungszeiten $\geq$10 Min. (K_o= 0 mM) zeigt die K-aktivierte Antwort (K_o =5.4 mM) einen konstanten Wert von τ, dabei ist die Na-Pumpe stark aktiviert (Abb.25). Eine Konstanz von G_m während der K-aktivierten Zellantwort ist nicht von vornherein anzunehmen. Eine Veränderung von G_m könnte möglicherweise die Bestimmung von τ beeinflussen.

Ein Argument, das gegen eine solche Änderung der Membranleitfähigkeit während der K-aktivierten Antwort im untersuchten Potentialbereich spricht, ist der Abfall der Hyperpolarisation nach einer e-Funktion.

Eine exponentielle Abnahme der Hyperpolarisation der K-aktivierten Antwort hätte dann ebenfalls eine exponentielle Änderung von G_m zur Voraussetzung (s. Gl. 2.2.2.7). Eine solche Annahme widerspricht experimentellen Befunden.

Strom-Spannungscharakteristiken zeigen im hyperpolarisierenden Bereich keine exponentielle Abhänigkeit der Membranleitfähigkeit von V. Aus Abb.13 geht jedoch eindeutig die exponentielle Abnahme der K-aktivierten Zellantwort hervor. Befunde, die am Ventrikelpräparat des Meerschweinchenherzens erhoben wurden, bestätigen die annäherende Linearität der Strom-Spannungscharakteristik im Potentialbereich von -60 mV bis -80 mV bei K_o=10 mM (TRAUTWEIN & McDONALD 1978).

Obwohl sich G_m als Funktion von K_o ändert (TRAUTWEIN & McDONALD) kann τ als Maß der Pumpaktivität benutzt werden. Für die Bestimmung von τ als Funktion von K_o ist nach Gl. 2.2.2.7 eine Änderung von G_m ohne Bedeutung für jede konstante K_o, da eine Änderung von G_m lediglich eine Änderung des Ordinatenabschnittes ergibt und die Steigung von $k = 1/\tau$ nicht beeinflußt.

Am Vagusnervenpräparat des Kaninchens konnte die exponentielle Abnahme der posttetanischen Hyperpolarisation gemessen werden; dabei war die Zeitkonstante der Abnahme umgekehrt proportional der K_o (RANG & RITCHIE 1968). Die Abhängigkeit der Zeitkonstante τ von K_o wurde am Arbeitsmyokard des Meerschweinchens gezeigt (Abb. 27) und die Hemmung der Hyperpolarisation durch DHO nachgewiesen (Abb. 18). Weiter bestätigen die Versuchsergebnisse am Trabekelpräparat aus dem Meerschweinchenvorhof die Unabhängigkeit der Zeitkonstante von der Zeitdauer in K-freier Lösung (K_o = 0mM $\geq$ 10 Min.). Die durch Na_i-Erhöhung nicht veränderten Zeitkonstanten der Depolarisation bei konstanter K_o lassen den Schluß zu, daß das Na : K-Kopplungsverhältnis unabhängig von Änderungen der intrazellulären Na-Konzentration ist. Ein konstantes Kopplungsverhältnis wird auch von anderen Autoren angenommen (Schafspurkinjefaser: EISNER et al. 1981a, Hundepurkinjefaser: GADSBY & CRANEFIELD 1979a).

Die Hemmung der elektrogenen Na-Pumpe an Purkinjefasern durch DHO wurde nachgewiesen (ISENBERG & TRAUTWEIN 1974) und an Schafspurkinjefasern bei $\sim 3 \times 10^{-5}$ M DHO eine 50 %-ige Hemmung der Änderung von a^i_{Na} gezeigt (DEITMER & ELLIS 1978). Aus dem Verlauf der Dosis-Wirkungskurve (Abb. 20) ergibt sich eine Hemmung der Hyperpolarisation von 50 % bei etwa derselben DHO-Konzentration. Ein flacher Verlauf liegt im Konzentrationsbereich von 10^{-6} M bis 10^{-5} M vor.

Die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 20) ergibt, daß bei vollständiger Hemmung der Na-K-Pumpe die Zeitkonstante der Depolarisation einer passiven Membranantwort entspricht. Die DHO-konzentrationsabhängige Hemmung verringert den Pumpbeitrag zum Membranpotential und verkürzt die Zeitkonstanten der Depolarisation. Aus der Depolarisation des Membranpotentials

im steady state (Abb. 17) kann auf einen ständigen Beitrag der Na-K-Pumpe zur Höhe des Potentials, der nicht elektrogen sein muß, geschlossen werden.

DEITMER & ELLIS (1978) fanden einen Anstieg von a^i_{Na} bei ihren Präparaten im Fließgleichgewicht, der eine Funktion der Herzglykosidkonzentration war. An Schafspurkinjefasern wurde nach einer Bespülungszeit der Präparate von 15 Minuten bei einer DHO-Konzentration größer als 5×10^{-6} M eine a^i_{Na} von etwa 30 mM gemessen (LEE, KANG, SOKOL & LEE 1980).

Der passive Na-Influx verringert das Membranpotential, und zusätzlich kann eine mögliche Akkumulation von K_o direkt an der extrazellulären Membranoberfläche zur Depolarisation beitragen.

Zur Analyse der Größe des elektrogenen Beitrages der Na-K-Pumpe zum Membranpotential bei Aktivierung der Na-Pumpe ist die Kenntnis der lokalen K_o-Konzentration von Bedeutung. Der Membranwiderstand isolierter Meerschweinchenvorhoftrabekel ist eine Funktion von K_o, mit Verringerung von K_o steigt der Eingangswiderstand an (GLITSCH et al. 1978). Sollte es durch die Aktivierung der Na-Pumpe zu einer lokalen K_o-Verarmung an der Zellmembran kommen, so würde der Beitrag einer elektrogenen Na-Pumpe zum Membranpotential als Folge eines erhöhten Membranwiderstandes größer sein.

Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die Na-K-Pumpe bei niedrigen K_o nicht voll aktiviert ist und der Beitrag dadurch verringert wird. Eine Verschiebung von E_k zu negativeren Werten führt zu einem negativeren Membranpotential, ohne daß eine Beteiligung der Na-Pumpe angenommen werden muß.

Aufgrund der engen interzellulären Spalträume kann es in Schafspurkinjefasern bei Aktivierung der Na-Pumpe zu einer K_o-Verarmung an der Zellmembran kommen (EISNER & LEDERER

1980a). An Purkinjefasern des Hundes, bei denen ein guter interzellulärer Lösungsaustausch angenommen werden kann (GADSBY & CRANEFIELD 1979b), ist die lokale K-Verarmung bei der Höhe des Membranpotentials wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung. EISNER & LEDERER (1980a) schließen aus der Verschiebung der Strom-Spannungsbeziehung nach einer Periode in K-freier Lösung am Schafspurkinjefaden auf einen elektrogenen Na-Pumpstrom, der jedoch von einer "K_o-depletion" überlagert ist. Die Autoren weisen die Aktivierung eines auswärtsgerichteten Na-Pumpstromes durch Rb_o nach. Die Größe dieses Stromes ist weitgehend potentialunabhängig.

Aus den Experimenten, die in den Abb. 21, 22 und 23 dargestellt sind, geht hervor, daß am Trabekelpräparat eine lokale K-Verarmung an der Zellmembran nicht die alleinige Ursache der gemessenen Hyperpolarisation sein kann, sondern daß ein elektrogener Beitrag der Na-Pumpe zur Höhe des Membranpotentials wahrscheinlich ist. Aus der Verkürzung der Aktionspotentialdauer kann auf einen elektrogenen von der Na-Pumpe getragenen Auswärtsstrom geschlossen werden (Abb. 23). Die Verkürzung der Aktionspotentialdauer an Purkinjefaserpräparaten des Hundeherzens nach kurzer Bespülung mit K-freier Lösung bei Rückkehr auf 4 mM K_o weist ebenfalls auf einen elektrogenen Beitrag der Na-Pumpe hin (GADSBY & CRANEFIELD 1979a).

Die in der vorliegenden Untersuchung angewandten Methoden ermöglichen die quantitative Erfassung und damit mathematische Beschreibung des Ouabain-hemmbaren Na-K-Transportes am Meerschweinchenvorhofpräparat. Die Verwendung von Rb als K-Ersatz gestattet genaue Messungen des unidirektionalen Rb-Influx, der Einsatz der Atom-Absorptions-Spektroskopie ermöglicht genaue quantitative Bestimmungen in niedrigen Konzentrationsbereichen an kleinen Gewebepräparaten.

Nur durch kontinuierliche intrazelluläre Registrierungen des Membranpotentials sind geringe Veränderungen dieser Meßgröße exakt bestimmbar. Durch die Verwendung von dünnen Trabekeln in der Versuchsserie II wurden kurze Diffusionsstrecken zwischen der Außenlösung undder Lösung direkt an der Zellmembran erzielt, so daß bei einem Wechsel der KCl-Konzentration in der Badlösung die Präparate innerhalb von 10 Sekunden auf die Änderungen der Konzentration reagierten. Die elektrophysiologische Methode ermöglichte durch die Bestimmung der Zeitkonstanten τ eine quantitative Beschreibung der Veränderung des Membranpotentials, die auf einen aktiven Beitrag der Na-K-Pumpe zurückzuführen ist. Die Untersuchung mit diesen unterschiedlichen Methoden ergab übereinstimmende neue Erkenntnisse über den Mechanismus, der die Na- und K-Gradienten über der Herzmuskelzellmembran aufrechterhält.

Insgesamt bestätigen die Versuchsergebnisse am Vorhof des Meerschweinchenherzens das Konzept der Na-K-Pumpe, wie es an Skelettmuskelpräparaten und am Reizleitungsgewebe des Herzens gefunden wurde. Die kinetischen Untersuchungen der Kationentransporte ergeben zum ersten Mal für ein Präparat des Arbeitsmyokards Hinweise auf die Anzahl der intrazellulären Na- und extrazellulären K-Bindungsstellen der Na-K-Pumpe. Nach den elektrophysiologischen Untersuchungen ist ein elektrogener Beitrag der Na-Pumpe zum Membranpotential an Zellen des Arbeitsmyokards sehr wahrscheinlich.

6. Zusammenfassung

1. An Präparaten des Meerschweinchenvorhofs wurde der Ouabain-hemmbare Na-K-Transport mit optischen und elektrophysiologischen Methoden untersucht. Bei der Bestimmung der Kinetik des Transportmechanismus wurde K (K_o: 0.67 - 5.4 mM) und als Substituent in K-freier Lösung Rb (Rb_o: 0.67 - 10.8 mM) verwendet. Die K-(Rb)Aufnahme in Vorhofpräparate wurde durch flammenphotometrische und atomabsorptionsspektrometrische Messungen ermittelt. Weitere Eigenschaften des aktiven K-Transports am Arbeitsmyokard wurden durch kontinuierliche Membranpotentialmessungen bei K-aktivierten Zellantworten erfaßt.

2. Die Meerschweinchenvorhofpräparate wurden durch Unterkühlungsperioden (T 6° C) von 4 h oder durch Bespülung mit K-freien Tyrodelösungen bei 34° C aus dem zellulären Fließgleichgewicht gebracht (non-steady state). Die Meßwerte während der Restitution zum steady state liefern Angaben über die Eigenschaften einer K-Pumpe an Arbeitsmyokardzellen.

3. Die kinetische Analyse der aktiven K-(Rb)Aufnahme in die Herzmuskelpräparate ergab eine halbmaximale Aktivierung der K-Aufnahme bei K_o = 1.1 mM bzw. der Rb-Aufnahme bei Rb_o = 3.2 mM. Der elektrophysiologisch ermittelte K_m-Wert (K_{me} = 2.1 mM) der K-Pumpe bestätigt die hohe Affinität des Transportsystems für K (Rb).

4. Die G öße der Ouabain-hemmbaren Rb-Aufnahme bei Rb_o = 1.35 mM wird als sigmoide Funktion von Na_i beschrieben. HILL-Koeffizienten für Na_i von h_{Na} = 3.5 und für K_o von h_K = 1.1 (Rb_o = 1.1) stehen in Übereinstimmung mit 3 Bindungsstellen für Na und 2 Bindungsstellen für K (Rb) am Na-K-Transportsystem (Carrier) der Herzmuskelzellmembran.

5. Nach der Konditionierung der Präparate in K-freien Lösungen für einige Minuten ($\geq$ 10 Min.) kommt es bei Zugabe K-haltiger Tyrodelösung zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials (K-aktivierte Antwort) und einer anschließenden Abnahme auf die Höhe des Ruhemembranpotentials.

6. Die Abnahme der K-aktivierten Antwort erfolgt exponentiell und wird durch die Zeitkonstante τ beschrieben.

7. Die Hemmung der Na-K-Pumpe durch das Herzglykosid DHO (Dihydro-g-strophanthin) wird an Trabekelpräparaten untersucht. Eine 50 % Hemmung der Hyperpolarisation tritt bei einer DHO-Konzentration von 3×10^{-5} M auf.

8. Die Zeitkonstante τ der K-aktivierten Antwort nimmt mit zunehmender DHO-Konzentration (10^{-6} M - 10^{-4} M) ab.

9. Die Zeitkonstante τ der Abnahme der K-aktivierten Antwort ist eine Funktion der extrazellulären K-Konzentration und unabhängig von Na_i. Unter Standardbedingungen (5.4 mM K_o) wird τ zu 3.5 ± 0.17 Minuten bestimmt.

10. Die K-induzierte Hyperpolarisation wird zu einem Teil auf die Aktivität einer elektrogenen Na-K-Pumpe zurückgeführt.

11. Das Problem der K-Verarmung (depletion) an der Zellmembran bei starker Aktivierung der Na-K-Pumpe wird untersucht. Bei etwa 30 % der Trabekelpräparate aus dem linken Meerschweinchenvorhof depolarisierte das Membranpotential in K-freier Lösung auf $\sim$ -50 mV. Bei einer anschließenden Bespülung der Präparate mit Standardtyrodelösungen tritt eine vorübergehende Hyperpolarisation des Membranpotentials auf. Diese Versuchsergebnisse zeigen, daß eine loka-

le K-Verarmung an der Außenseite der Herzmuskelzellmembran nicht alleinige Ursache der K-aktivierten Antwort ist. Es wird auf einen direkten (elektrogenen) Beitrag der Na-K-Pumpe zur Höhe des Membranpotentials geschlossen.

7. Liste der verwendeten Abkürzungen

a^{i}_{Na}	intrazelluläre Natriumaktivität
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
DHO	Dihydro-g-strophanthin
E_K, E_{Na}	Kalium- bzw. Natriumgleichgewichtspotential
F	Faraday- Konstante
^{o}C	Grad Celsius
G_m	Membranleitfähigkeit
K_o, K_i	extrazelluläre bzw. intrazelluläre Kaliumkonzentration
Min., s,ms	Minute, Sekunde, Millisekunde
ml	Milliliter
mM, M	millimolar, molar
Mol/lF.W.	Mol pro Liter Faserwasser
mV, V	Millivolt, Volt
Na_o, Na_i	extrazelluläre bzw. intrazelluläre Natriumkonzentration
P_K, P_{Na}	K^+- bzw. Na^+-Permeabilität der Zellmembran
R	universelle Gaskonstante
R_m	Membranwiderstand
Rb_o	extrazelluläre Rubidiumkonzentration
T	absolute Temperatur

8. Literaturverzeichnis

- Adrian, R.H., C.L. Slayman (1966)
Membrane potential and conductance during transport of sodium, potassium and rubidium in frog muscle
J. Physiol. 184, 970-1014

- Akera, T., Yamamoto, S., Temma, K., Kim, D.-H. & Brody, T.M. (1981)
Is Ouabain-sensitive rubidium or potassium uptake a measure of sodium pump activity in isolated cardiac muscle?
Biochem. Biophys. Acta 640. 779-790

- Auditore, J.V. & Murray, L. (1962)
Cardiac (microsomal) Na+ K adenosinetriphosphatase and its possible relationship to the active Na + K transport system
Arch. Biochem. Biophys. 99, 372-382

- Baker, P.F., Blaustein, M.P., Keynes, R.D., Manil, J. Shaw, T.J.,Steinhardt,R.A.(1969)
The Ouabain-sensitive flu xes of sodium and potassium in squid giant axons
J. Physiol. 200, 459-496

- Bargmann, W. (1967)
Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen
6. Auflage, 784 S.
Georg Thieme Verlag Stuttgart

- Bosteels, S. & Carmeliet, E. (1972)
Estimation of intracellular Na-concentration and trans-membrane Na-flux in cardiac Purkyně fibres
Pflügers Arch. 336, 35-37

- Boyle, P.J. & Conway, E.J. (1941)
Potassium accumulation in muscle and associated changes
J. Physiol. 100, 1-63

- Carmeliet, E.E. (1964)
Influence of lithium ion on the transmembrane potential and cation content of cardiac cells
J. gen. Physiol. 47, 501-530

- Casteels. R. (1969)
Calculation of the membrane potential in smooth muscle cells of the guinea-pig's taenia coli by the Goldman equation
J. Physiol. 205, 193-208

- Conway, E.J., Kernan, R.P. & Zadunaisky, J.A. (1961)
The sodium pump in skeltal muscle in relation to energy barniers
J.Physiol. 155, 263-279

- Cross, S.B., Keynes, R.D. & Rybova, R. (1965)
The coupling of sodium efflux and potassium influx in frog muscle
J. Physiol. 181, 865-880

- Deitmer, J.W. & Ellis, D. (1978)
The intracellular sodium activity of cardiac Purkinje fibres during inhibition and re-activation of the Na-K-pump
J. Physiol. 284, 241-259

- Desmedt, J.E. (1953)
Electrical activity and intracellular sodium concentration in frog muscle
J. Physiol. 121, 191-205

- Dydynska, M. & Harris, E.J. (1966)
Consumption of high-energy phosphates during active sodium and potassium interchange in frog muscle
J. Physiol. 182, 92-109

- Eisenthal, R. & Cornish-Bowden, A. (1974)
The direct linear plot. A new graphical producture for estimating enzyme Kinetic parameters
Biochem. J. 139. 715-720

- Eisner, D.A. & Lederer, W.J. (1979)
The role of the sodium pump in the effects of potassium-depleted solutions on mammalian cardiac muscle
J. Physiol. 294, 279-301

- Eisner, D.A. & Lederer, W.J. (1980a)
Characterization of the electrogenic sodium pump in cardiac Purkinje fibres
J. Physiol. 303. 441-474

- Eisner, D.A. & Lederer, W.J. (1980b)
The relationship between sodium activity and twitch tension in cardiac Purkinje fibres
J. Physiol. 303, 475-494

- Eisner, D.A., Lederer, W.J. & Vaughan-Jones, R.D. (1981a)
The dependence of sodium pumping and tension on intracellular sodium activity in voltage-clamped sheep Purkinje fibres
J. Physiol. 317, 163-187

- Eisner, D.A., Lederer, W.J. & Vaughan-Jones, R.D. (1981b)
The effect of rubidium ions and membrane potential in the intracellular sodium activity of sheep purkinje fibres
J. Physiol. 317, 189-205

- Ellis, D. & Deitmer, J.W. (1978)
The relationship between the intra- and extracellular sodium activity of sheep heart Purkinje fibres during inhibition of the Na-K-pump
Pflügers Arch. 377, 209-215

- Epstein, W. (1975)
in: Biochemistry of cell walls and membranes
Vol. 2 (ed. C.F. Fox) p. 249
Baltimore, Md. University park press London: Butterworth

- Fozzard, H.A. & Sleator, W. (1967)
Membrane ionic conductance during rest and activity in guinea-pig atrial muscle
Am. J. Physiol. 212 (4), 945-952

- Gadsby, D.C. (1980a)
Hyperpolarization of frog skeletal muscle fibres and of canine cardiac Purkinje fibres during enhanced Na^+/K^+ exchange: extracellular K^+ depletion or increased pump current?
Current Topics in Membranes and Transport 16, 17 - 34
in: Electrogenic Ion Pumps, C.L. Slaymann (editor)
Academic Press New York, 1982

- Gadsby, D.C. (1980b)
Activation of electrogenic Na^+/K^+ exchange by extracellular K^+ in canine cardiac Purkinje fibres
Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 4035-4039

- Gadsby, D.C. & Cranefield, P.F. (1979a)
Electrogenic sodium extrusion in cardiac Purkinje fibres
J. gen. Physiol. 73, 819-837

- Gadsby, D.C. & Cranefield, P.F. (1979b)
Direct measurement of changes in sodium pump current in canine cardiac Purkinje fibres
Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (4), 1783-1787

- Garrahan, P.J. & Glynn, J.M. (1967)
The sensitivity of the sodium pump to external sodium
J. Physiol. 192, 175-188

- Glitsch, H.G. (1969)
Über das Membranpotential des Meerschweinchenvorhofes nach Hypothermie
Pflügers Arch. 307, 29-46

- Glitsch, H.G. (1972a)
Activation of the electrogenic sodium pump in guinea pig auricles by internal sodium ions
J. Physiol. 220, 565-582

- Glitsch, H.G. (1972b)
Hemmung der elektrogenen Na-Pumpe am Meerschweinchenvorhof durch Digitoxigenin
Pflügers Arch. 335, 243-251

- Glitsch, H.G. (1979)
Characteristics of active Na-transport in intact cardiac cells
Am. J. Physiol. 236 (2), H 189-199

- Glitsch, H.G., Grabowski, W. & Thielen, J. (1978)
Activation of the electrogenic sodium pump in guinea pig atria by external potassium ions
J. Physiol. 276, 515-524

- Glitsch, H.G., Kampmann, W. & Pusch, H. (1981)
Activation of active Na-transport in sheep Purkinje-fibres by external K or Rb ions
Pflügers Arch. 391. 28-34

- Glitsch, H.G., Pusch, H. & Vassort, G. (1979)
An estimation of the intracellular Na activity in guinea-pig atrial cells
Pflügers Arch. 379, Suppl. R 2

- Glitsch, H.G., Pusch, H. & Venetz, K. (1976)
Effects of Na and K-ions on the active Na- transport in guinea-pig auricles
Pflügers Arch. 365, 29-36

- Glitsch, H.G. & Pusch, H. (1980)
Correlation between changes in membrane potential and intracellular sodium activity during K activated response in sheep Purkinje fibres
Pflügers Arch. 384, 189-191

- Glitsch, H.G. & Thielen, J. (1980)
Kinetics and ionic dependence of Ouabain-sensitive Rb-uptake in guinea-pig atria
Proc. XXVIII Int. Cong. Physiol. Sci. Budapest 14, No. 1567

- Glynn, J.M. (1956)
Sodium and potassium movements in human red cells
J. Physiol. 134, 278-310

- Glynn, J.M. & Karlish, S.J.D. (1975)
The sodium pump
Am. Rev. Physiol. 37. 13-55

- Glynn, J.M. & Karlish, S.J.D. (1976)
ATP-hydrolysis associated with an uncoupled sodium flux through the sodium pump: evidence for allosteric effects of intracellular ATP and extracellular sodium
J. Physiol. 256, 465-496

- Glynn, J.M., Lew, V.I., Lüthi, U. (1970)
Reversal of the potassium entry mechanism in red cells with and without reversal of the entire pump cycle
J. Physiol. 207, 371-391

- Haas, H.G., Glitsch, H.G. & Trautwein, W. (1963)
Natrium-Fluxe am Vorhof des Froschherzens
Pflügers Arch. 277, 36-47

- Haas, H.G., Hantsch, F., Otter, H.P. & Siegel, G. (1967)
Untersuchungen zum Problem des aktiven K und Na-Transportes am Myokard
Pflügers Arch. 294, 144-168

- Harris, E.J. (1950)
The transfer of sodium and potassium ions between muscle and the surrounding medium
Trans. Faraday Soc. 46, 872-882

- Hiraoka, M. & Hecht, H.H. (1973)
Recovery from hypothermia in cardiac Purkinje fibres: considerations for an electrogenic mechanism
Pflügers Arch. 339, 25-36

- Hodgkin, A.L. & Keynes, R.D. (1955)
Active transport of cations in giant axons from sepia and Loligo
J. Physiol. 128, 28-60

- Höfer, M. (1977)
Transport durch biologische Membranen
128 S., Verlag Chemie Weinheim New York

- Hoffmann, B.F. & Cranefield, P.F. (1960)
Electrophysiology of the heart
Mc Graw-Hill New York - Toronto - London

- Hougen, T.J. & Smith, T.W. (1978)
Inhibitions of monovalent cation active transport by subtoxic doses of Ouabain in the dog
Circ. Res. 42, 856-863

- Isenberg, G. & Trautwein, W. (1974)
The effect of Dihydro-Ouabain and Lithium-ions on the outward current in cardiac Purkinje fibres
Pflügers Arch. 350, 41-54

- Isenberg, G. &. Trautwein, W. (1975)
Temperature sensitivity of outward current in cardiac Purkinje fibres, evidence for electrogenicity of active transport
Pflügers Arch. 358, 225-234

- Johnson, J.A. (1957)
Sodium exchange in the frog heart ventricele
Am. J. Physiol. 191 (3), 487-492

- Kennedy, B.G. & De Weer, P. (1977)
Relationship between Na:K and exchange by the sodium pump of skeletal muscle
Nature 268, 165-167

- Kerkut, G.A. & Thomas, R.C. (1965)
An electrogenic sodium pump in snail nerve cells
Comp. Biochem. Physiol. 14, 167-183

- Kernan, R.P. (1962)
Membrane potential changes during sodium transport in frog sartorius muscle
Nature 193, 986-987

- Keynes, R.D. (1951)
The ionic movements during nervous activity
J. Physiol. 114, 119-150

- Keynes, R.D. (1954)
The ionic fluxes in frog muscle
Proc. Roy. Soc. 142, 359-382

- Keynes, R.D. & Maisel, G.W. (1954)
The energy requirement for sodium extrusion from a frog muscle
Proc. Roy. soc. 142, 383-392

- Kotyk, A. (1977)
Nonlinearity of reciprocal plots in transport kinetics
S. 212-220 in: Biochemisty of membrane transport
Ed. by Semenza, G. & Carafoli, E.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1977

- Ku, D., Akera, T., Pew, C.L. & Brody, T.M. (1974)
Cardiac glycoside: Correlations among Na^+, K^+-ATPase sodium pump and contractility in the guinea-pig heart
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 285. 185-200

- Langer, G.A. (1968)
Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility
Physiol. Rev. 48, 708-757

- Langer, G.A. & Brady, A.J. (1974)
The mammalian myocardium
John Wiley & Sons 310 S.
New York, London, Sydney, Toronto

- Lee, C.O. & Fozzard, H.A. (1975)
Activities of potassium and sodium ions in rabbit heart muscle
J. gen. Physiol. 65, 695-708

- Lee, C.O., Kang, D.H., Sokol, J.H. & Lee, K.S. (1980)
Relation between intracellular Na ion activity and tension of sheep cardiac Purkinje fibres exposed to Dihydro-Ouabain
Biophysical J. 29, 315-330

- Lehninger, A.L. (1970)
Biochemistry
The molecular basis of cell structure and function,
833 S. Worth Publishers New York N.Y.

- Leonhardt, H. (1974)
Histologie, Zytologie and Mikroanatomie des Menschen
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 467 S.

- Lindenmayer, G.E., Laughter, A.H., Schwartz, A. (1968)
Incorporation of inorganic Phosphate - 32 into a Na^+, K^+-ATPase Preparation: Stimulation by Ouabain
Arch. Biochem. Biophys. 127 , 187-192

- Longmore, D. (1971)
Forschungsobjekt Herz, Funktion, Krankheit und Heilung
Kindler Verlag München,252 S.

- Lüttgau. H.Ch.. & Glitsch, H.G. (1976)
Membrane physiology of nerve and muscle fibres
Fortschr. d. Zoologie 24. Heft 1
Gustav Fischer Stuttgart, New York

- Müller, R. (1964)
Potassium and rubidium exchange across the surface membrane of cardiac Purkinje fibres
J. Physiol. 177, 453-462

- Nelson, M.T. & Blaustein, M.P. (1980)
Properties of sodium pump in internaly perfused barnacle muscle fibres
J. Physiol. 75, 183-206

- Nernst, W. (1889)
Die elektromotorische Wirksamkeit der Ionen
Z. physik. Chem. 4, 129-181

- Noma, A. & Irisawa, H. (1975)
Contribution of an electrogenic sodium pump to the membrane potential in rabbit sinoatrial node cells
Pflügers Arch. 358, 289-301

-Page, E. & Storm, S.R. (1965)
Cat heart muscle in vitro VIII Active transport of sodium in papillary muscles
J. gen. Physiol. 48, 957-972

- Portius, H.J. & Repke, K.R.H. (1967)
Eigenschaften und Funktion des Na^+-K^+-aktivierten Mg^{++}-abhängigen Adenosintriphosphat
Phophohydrolase-System des Herzmuskels
Acta biol. med. german. 19, 907-938

- Post, R.L., Hegyvary, C. & Kume, S. (1972)
Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase
J. biol. Chem. 247, 6530-6540

- Post, R.L., Kume, S., Tobin, T., Orcutt, B. & Sen, A.K. (1969)
Flexibility of an active center in sodium-plus potassium adenosine triphosphatase
J. gen. Physiol. 54, 306-326

- Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R. & Albright, C.D. (1960)
Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte
J. biol. Chem. 235, 1796-1802

- Priestland, R.N. & Whittam, R. (1968)
The influence of external sodium ions on the sodium pump in erythrocytes
Biochem. J. 109, 369-374

- Rang, H.P. & Ritchie, J.M. (1968)
On the electrogenic sodium pump in mammalian non myelinated nerve fibres and its activation by various external cations
J. Physiol. 196, 183-221

- Reindell, H. & Roskamm, H. (1977)
Herzkrankheiten, Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie
930 S. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

- Reuter, H. (1974)
Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium. Mechanisms and physiological significance
Circulation Res. 34. 599-605

- Robinson, J.D. (1967)
Kinetic studies on a brain microsomal adenosine triphosphatase. Evidence suggesting conformational changes
Biochemisty 6, 3250-3258

- Roland, K.D. & Dunham, P.B. (1980)
Kinetics of lithium efflux through the (Na-K)pump of human erythrocytes
Biochem. Biophys. Acta 602, 376-388

- Schatzmann (1953)
Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran
Helv. physiol. pharmacol. Acta 11, 346-354

- Schmidt, R.F. & Thews, G., Hrsg. (1977)
Physiologie des Menschen.
19. Auflage 721 S. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

- Schoenberg, M. & Fozzard, H.A. (1979)
The influence of intercellular clefts in the electrical properties of sheep cardiac Purkinje fibres
Biophys. J. 25, 217-234

- Schwartz, A. (1977)
Newer aspects of cardiac glycoside action
Fed. Proc. 36, 2207-2208

- Schwartz, A., Lindenmayer, G.E. & Allen, J.C. (1972)
The Na^+, K^+-ATPase membrane transport system: Importance in cellular function
Curr. Top. Membr. Transp. 3, 1-82

- Schwartz, V. (1973)
Vergleichende Entwicklungsgeschichte der Tiere
Ein kurzes Lehrbuch 414 S.
Georg Thieme Verlag Stuttgart

- Segel, J.M. (1976)
Biochemical calculations. How to solve mathematical problems in general biochemisty
441 S. John Wiley & Sons, New York, Sydney, Toronto

- Siegel, G.J., Koval, G.J. & Albers, R.W. (1969)
Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase
J. biol. chem. 244, 3264-3269

- Sjodin, R.A. (1971)
The kinetics of sodium extrusion in striated muscle as functions of external sodium and potassium ion concentrations
J. gen. Physiol. 57, 164-187

- Sjodin, R.A. & Beauge, L.A. (1968a)
Coupling and selectivity of sodium and potassium transport in squid giant axons
J. gen. Physiol. 51, 152-161

- Sjodin, R.A. & Beauge, L.A. (1968b)
Strophanthidin-sensitive components of potassium and sodium movements in skeletal muscle as influenced by the internal sodium concentration
J. gen. Physiol. 52, 389-407

- Skou, J.Ch. (1957)
The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves
Biochem. Biophys. Acta 23, 394-401

- Skou, J.Ch. (1960)
Further investigations on a (Mg^{++} +Na^{+}) activated adenosine triphosphatase possibly related to the active linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane
Biochem. Biophys. Acta 42, 6-23

- Skou, J.Ch. (1965)
Enzymatic basis for active transport of Na^{+} and K^{+} across cell membrane
Physiol. Rev. 45, 596-617

- Skou, J.Ch. (1975)
The (Na^{+} +K^{+}) activated enzyme system and its relationship to transport of sodium and potassium
Quarterly Rev. of Biophys. 7 (3), 401-434

- Sommer, J.R. & Johnson, E.A. (1968)
Cardiac muscle: A comparative study of Purkinje fibres and ventricular fibres
J. Cell. Biol. 36, 497-526

- Steinbach, H.B. (1940)
Sodium and potassium in frog muscle
J. biol. chem. 133, 695-701

- Stekoven, F.S. & Bonting, S.L. (1981)
Transport adenosine triphosphatases: Properties and functions
Physiol. Rev. 61, 1-76

-Thomas, R.C. (1968)
Measurement of current produced by the sodium pump in a snail neurone
J. Physiol. 195, 23 P

-Thomas, R.C. (1972)
Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells
Physiol. Rev. 52, 563-594

-Trautwein, W. & McDonald, T.F. (1978)
Current-voltage relations in ventricular muscle preparations from different species
Pflügers Arch. 374, 79 - 89

-Ussing, H.H. (1949)
The distinction by means of tracers between active transport and diffusion
Acta physiol. scand. 19, 43 -56

-Weidmann, S. (1956)
Elektrophysiologie der Herzmuskelfaser
Verlag Hans Huber Bern

-Welz, B. (1975)
Atom-Absorptions-Spektroskopie
296 S. Verlag Chemie Weinheim/ Bergstraße

-Winegrad, S. & Shanes, A.M. (1962)
Calcium flux and contractility in guinea pig atria
J.gen.Physiol. 45, 371 -394

-Yamamoto, S. Akera, T. & Brody, T. (1979)
Sodium influx rate and ouabain-sensitive rubidium uptake in isolated guinea pig atria
Biochim. Biophys. Acta 555, 270 - 284

L e b e n s l a u f

Geboren am	06.Juli 1950
	in Bottrop, NRW
Schulbesuch	1957 - 1962
	Volksschule in Oberhausen
	1962 - 1970
	Gymnasium in Oberhausen
	1970 Reifeprüfung
Grundwehrdienst bei der Bundeswehr	1970 - 1971
Studium und Ausbildung	1971 - 1976
	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
	1976 Diplom in Biologie
	1977 - 1978
	Referendarausbildung für das Lehramt am Gymnasium
	1978
	2. Staatsexamen für das Lehramt am Gymnasium
	1978 - 1981
	Dissertation an der Abteilung für Biologie der Ruhr - Universität Bochum
	September 1981
	Studienrat z.A. am Gymnasium in Oberhausen

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI

Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545/8791